

jp06502548/pn

L2 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2003 THOMSON DERWENT on STN

ACCESSION NUMBER: 1993-076515 [09] WPINDEX

DOC. NO. CPI: C1993-033779

TITLE: Protein expression and secretion system in
corynebacteria

- transformed with cassette contg. signal sequence of
protein PS1 or 2 in chromosome or plasmid DNA region,

for

repetitive synthetic aminoacid polymer and polypeptide
prodn..

DERWENT CLASS: B04 D16

INVENTOR(S): DUCHIRON, F; GUYONVARCH, A; JOLIFF, G; LEBLON, G;
RELANO,

P; RENAUD, M; REYES, A O; HAHN, V

PATENT ASSIGNEE(S): (ORSA-N) ORSAN

COUNTRY COUNT: 17

PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG	MAIN	IPC
WO 9303158	A1	19930218	(199309)*	FR	95	C12N015-77	
RW: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU MC NL SE							
W: JP US							
FR 2679921	A1	19930205	(199314)		13	C12N015-77	
FR 2679922	A1	19930205	(199314)		19	C12N015-77	
EP 551506	A1	19930721	(199329)	FR	95	C12N015-77	
R: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC NL SE							
JP 06502548	W	19940324	(199417)		95	C12N015-77	<--
US 6027920	A	20000222	(200017)			C07K014-34	

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
WO 9303158	A1	WO 1992-FR744	19920729
FR 2679921	A1	FR 1991-9652	19910730
FR 2679922	A1	FR 1991-9870	19910802
EP 551506	A1	EP 1992-917803	19920729
		WO 1992-FR744	19920729
JP 06502548	W	WO 1992-FR744	19920729
		JP 1993-503324	19920729
US 6027920	A	WO 1992-FR744	19920729
	Cont of	US 1993-39028	19930329
	Cont of	US 1995-508761	19950731

FILING DETAILS:

PATENT NO	KIND	PATENT NO
EP 551506	A1 Based on	WO 9303158
JP 06502548	W Based on	WO 9303158

PRIORITY APPLN. INFO: FR 1991-9870 19910802; FR 1991-9652
19910730

REFERENCE PATENTS: 2.Jnl.Ref; FR 2575492; WO 8809821

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN: C07K014-34; C12N015-77
SECONDARY: A61K039-00; A61K039-395; A61K039-40; C07K013-00;
C07K015-00; C12N001-21; C12N015-11; C12N015-62;

C12N015-90; C12P013-04; C12P021-02; C12P021-08
C12N015-77; C12R001-13

INDEX:

BASIC ABSTRACT:

WO 9303158 A UPAB: 20000412

The sequence encoding aminoacid, polypeptide or protein (I) is in a chromosome or plasmid DNA region where it is transcribed, towards the 5'-end, with at least a part (A) of the sequence encoding the signal sequence of proteins PS1 or PS2. (A) ensures secretion of (I), after translation when the system is included into a corynebacterium.

Bacterial strains contain this expression system, proteins (Ia) contain all or part of the sequence of PS1 or PS2 and antibodies are directed against PS1 and PS2.

Prof. the system contains, apart from the bacterial cell, a secretion cassette comprising (1) a 1st DNA sequence functional for expression in the host; (2) a 2nd DNA sequence encoding (I) and (3) a 3rd DNA sequence,

between the 1st two, encoding (A).

USE/ADVANTAGE - Produces aminoacid sequences, e.g. polymers of Ala-Gln or Ala-Glu-Lys, from which the repeating units may be isolated

by pref. enzymatic treatment. It ensures secretion of the prod. into the culture medium for recovery.

Proteins contg. (part of) PS1 or PS2, and antibodies directed

against them, are useful in diagnostic kits
Dwg.0/22

FILE SEGMENT: CPI

FIELD AVAILABILITY: AB

MANUAL CODES: CPI: B04-B02B1; B04-B04A1; B04-B04A3; B04-B04C3; B04-

C01;

B10-B02; D05-C12; D05-H04; D05-H09; D05-H12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-502548

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)3月24日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/77	Z N A		
A 6 1 K 39/00		A 9284-4C	
39/395		A 9284-4C	
		H 9284-4C	
C 1 2 N 1/21		7236-4B	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 32 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平5-503324
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)7月29日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)3月30日
 (86) 国際出願番号 P C T / F R 9 2 / 0 0 7 4 4
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 0 3 1 5 8
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)2月18日
 (31) 優先権主張番号 9 1 / 0 9 6 5 2
 (32) 優先日 1991年7月30日
 (33) 優先権主張国 フランス (F R)
 (31) 優先権主張番号 9 1 / 0 9 8 7 0
 (32) 優先日 1991年8月2日
 (33) 優先権主張国 フランス (F R)

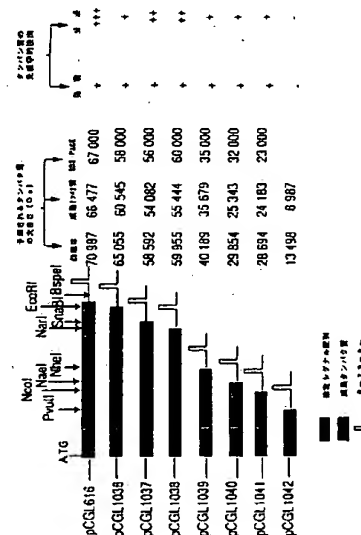
(71) 出願人 オルサン
 フランス国バリ、リュ、バリユ、16
 (72) 発明者 ジョリフ、グワンナエル
 フランス国バリ、リュ、トリュフォー、48
 (72) 発明者 ギヨンバルシュ、アルメル
 フランス国ラーイ、レ、ローズ、アブニ
 ュ、フルーケ、21
 (72) 発明者 レラノ、ビュリフィカション
 フランス国フォントネ、オ、ローズ、リ
 ュ、ピエールレ、12
 (74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特にコリネバクテリア中で用いることのできる蛋白質の発現および分泌系

(57) 【要約】

コリネバクテリアによるアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系である。この系は、そのアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が染色体またはプラスミドDNAの領域内に置かれ、その配列が、蛋白質 P S 1 または P S 2 のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分(この部分はコリネバクテリア菌株へこの系が取り込まれた時、翻訳後のその蛋白質の分泌を保证する)とともに5'末端に向かって転写されることを特徴とするものである。



1. コリネバクテリア菌株による所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系であって、上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、染色体またはプラスミドDNAの領域内に位置しており、この領域内では該配列が、蛋白質PS1またはPS2のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分とともに5'末端に向かって転写され、該部分は、該系がコリネバクテリア菌株に取り込まれた時、翻訳後の上記蛋白質の分泌を保證するものであることを特徴とする、系。

2. 次の構成から成るコリネバクテリアの発現および分泌系であって

- コリネバクテリア菌株と、
- 上記コリネバクテリア菌株中の発現のための第一機能性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二DNA配列、および上記第一および第二DNA配列の間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、上記第三DNA配列は、上記コリネバクテリア菌株により上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保證するPS1またはPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードするものである、系。

項1~9のいずれか一項記載の系。

11. 所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌が、温度、培養液および糖の性質によって制御される、請求項1~10のいずれか一項記載の系。

12. コード配列が1つ以上の反復アミノ酸のポリマーをコードする配列である、請求項1~11のいずれか一項記載の系。

13. 反復配列における反復単位が、COOH末端部において正または負に荷電したアミノ酸を含んでなる、請求項1~12のいずれか一項記載の系。

14. ポリペプチドのイオン特性がその単離を可能にする、請求項1~13のいずれか一項記載の系。

15. 荷電したアミノ酸が、特定のプロテアーゼによりペプチドの切断をそのレベルで可能にする、請求項1~14のいずれか一項記載の系。

16. 荷電したアミノ酸が特定のカルボキシペプチダーゼにより除去できる、請求項1~15のいずれか一項記載の系。

17. マーカー遺伝子がcelA遺伝子である、請求項1~16のいずれか一項記載の系。

18. コード配列が、第17図に対応するgdhAのすべてまたは一部を含んでなる、請求項1~17のいずれか一項記載の系。

3. コリネバクテリアの菌株がBrevibacterium属に属するものである、請求項1または2に記載の発現および分泌系。

4. 発現のための第一機能性DNA配列がプロモーターおよびリボソーム結合部位を含んでなる、請求項1~3のいずれか一項記載の発現および分泌系。

5. 分泌カセットがコリネバクテリア菌株中で機能する複製起源を含む自律的に複製するプラスミドにより保持されている、請求項1~4のいずれか一項記載の発現および分泌系。

6. 分泌カセットがコリネバクテリア菌株の染色体へのその組込みを保證するDNAの要素を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の発現および分泌系。

7. 上記第三DNA配列がPS1またはPS2のシグナル配列のすべてまたは一部を含んでなる、請求項1~6のいずれか一項記載の発現および分泌系。

8. コード配列の端部の翻訳停止配列、転写停止配列およびマーカー遺伝子をさらに含んでなる、請求項1~7のいずれか一項記載の発現および分泌系。

9. 所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、同一相でcsp1またはcsp2遺伝子に挿入されている、請求項1~8のいずれか一項記載の系。

10. PS1またはPS2配列が切形である、請求

19. 発現のための機能性DNA配列が、csp1、csp2またはgdhAの発現要素から選ばれるものである、請求項1~18のいずれか一項記載の系。

20. 発現が塩、代謝産物および糖の濃度に依存する、請求項1~19のいずれか一項記載の系。

21. コード配列の発現前において、プロモーターが、csp1、csp2またはgdhAプロモーターから選ばれるものである、請求項1~20のいずれか一項記載の系。

22. マーカー遺伝子がlacZ遺伝子である、請求項1~21のいずれか一項記載の系。

23. 請求項1~22のいずれか一項記載の発現および分泌系を使用して得られる、バクテリア菌株。

24. 菌株がコリネバクテリアである、請求項23に記載の菌株。

25. 菌株がブレヴィバクテリアである、請求項24に記載の菌株。

26. 菌株がBrevibacterium lactofermentumである、請求項25に記載のコリネバクテリア菌株。

27. 所定の蛋白質が、その固定作用を有するPS1またはPS2部位により壁上に固定されている、請求項23~26のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株。

28. 菌株が、その壁上に固定されたPS1または

P S 2 の抗原エピトープを育する、請求項 23 ~ 26 のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株。

29. アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質を生成する方法であって、請求項 23 ~ 28 のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株を培養液中で培養し、第二 DNA 配列が上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードし、培養後、上記生成物を、培養液および/またはバクテリア濃縮物から任意に分離することを含んでなる、方法。

30. P S 1 または P S 2 と融合または別な方法で結合した所定の蛋白質が、表面活性剤を使用してバクテリア細胞から分離される、請求項 29 に記載の方法。

31. P S 1 または P S 2 配列のすべてまたは一部を含む、蛋白質。

32. P S 1 または P S 2 の抗原部位を含む、蛋白質。

33. 抗原要素として、請求項 31 または 32 記載の蛋白質。

34. P S 1 または P S 2 に対する、抗体。

すぎない。

米国特許第 4, 965, 197 号は、上記 DN アーゼの下で *Corynebacterium* に用いることのできる発現および分泌系について述べているが、この場合の蛋白質は主成分ではなく、またこれら条件の下では、対応する分泌系はあまり重要ではないように思われる。

従って、本発明は、特定のコリネバクテリアの培養液上澄み中に高い割合で存在する二つの蛋白質の分泌のための要素を含むコリネバクテリア型のバクテリアにおける発現および分泌系に関する。

本発明は、特にコリネバクテリア菌株により所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系であって、上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、染色体またはプラスミド DNA の領域内に位置しており、この領域内では上記配列が、蛋白質 P S 1 または P S 2 のシグナル配列をコードする配列の少なくとも 1 つの部分とともに 5' 端部に向かって転写され、上記部分は、系が上記コリネバクテリア菌株に取り込まれた時、翻訳後の上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の分泌が保証するものであることを特徴とする系に関する。

さらに、本発明は、コリネバクテリアの発現および分泌系であって、

- コリネバクテリア菌株と、

特にコリネバクテリア中で用いることのできる蛋白質の発現および分泌系

本発明は、特にコリネバクテリア中で使用することのできる蛋白質の発現および分泌系、この系を使用する方法、およびこれら発現系に関連した新規な蛋白質に関する。

コリネバクテリアとは、さまざまな菌株によって表示される不規則な形態の一群のグラム陽性バクテリアのことである。

グラム陽性細胞は、外部培地への蛋白質の分泌を容易にする簡単な構造を有するという事実にもかかわらず、コリネバクテリアによる蛋白質の分泌は、今日迄あまり広く研究されていない。毒性⁺の溶原性ファージ (Smith 1980: J. Bacteriol., 141, 1142 頁; Smith 等, 1980: J. Bacteriol., 141, 184 頁; Greenfield 等, 1983: PHAS USA 80, 6853 頁) に感染した *Corynebacterium diphtheriae* の特定の菌株によって分泌されたジフテリア毒素および *Corynebacterium glutamicum* (W. Liebl 等, A.S. Sinksey, 1986: バクテリアの遺伝子学および生物工学, 1 巻, 383-388 頁) による DN アーゼの分泌に伴う遺伝子のヌクレオチド配列の研究が報告されているに

- 上記コリネバクテリア菌株中の発現のための第一機能性 DNA 配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二 DNA 配列、および上記第一および第二 DNA 配列間に挿入された第三 DNA 配列を含む分泌カセットとを含んでなり、上記第三 DNA 配列は、上記コリネバクテリア菌株により上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保証する P S 1 または P S 2 から選ばれた蛋白質の要素をコードするもの、である系に関する。

まず、本発明の構成において、「コリネバクテリア」とは *Corynebacterium* 属の菌株のみならず *Brevibacterium* のような同属のバクテリアの菌株をも指すものと理解すべきである。

本発明の発現系はコリネバクテリア中で自動的に複製するプラスミド中に存在し、この場合、プラスミドは、例えば *Corynebacterium* の菌株中で機能する複製起源、即ち複製起源 P B L 1 を含むが、また上記発現系は、染色体組込み用に特別に設けられた複製不能なプラスミドに保持することもでき、この場合、プラスミドは染色体組換えおよび組込みを可能にする要素を含んでなる。この組込みの場合、発現系は最終的に上記バクテリアの染色体中に存在する。

特に、染色体組込みの場合、P S 1 をコードする遺伝子 C S P 1 または P S 2 をコードする遺伝子 C S P 2 へ

の異種DNA配列の挿入は、対応する菌株の成長に影響を及ぼさないことが実証されている。これらの条件の下では、挿入したコード配列の発現による生成物を発現/分泌させるために、CSP1またはCSP2の相の中でアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列を一体化することが可能である。

コリネバクテリア菌株中の発現のための機能性DNA配列としては、相同発現用要素および異種発現用要素の両方を挙げるができる。即ち、これら要素は宿主のバクテリア中にすでに存在している要素、またはこれとは異なり、異なるバクテリアから誘導される要素でもよい。

これら発現要素は、プロモーターおよびリボソーム結合部位を本質的に含んでいるが、他の要素、特に発現を調整するタイプの要素であることも可能である。

コリネバクテリア中で使用することのできる発現要素としては、強力なプロモーターであるP_{1a}とプロモーター、IPTGにより誘導され且つE. coliのようなコリネバクテリア中で作用することが解っているtrp/lacハイブリッドが特に使用される。しかしながら、他のプロモーター、例えば下記のプロモーター、またはコリネバクテリアの構造遺伝子発現のための他の要素、例えばgdhAプロモーターを使用することが可能である。また、例えば、発現要素、特に本発明の範囲内にあると認

められる蛋白質PS1および/またはPS2の一方のプロモーターを使用することも可能である。

また、発現要素は遺伝子の下流領域の発現の調整を保證するDNA配列を含むこともできる。

良好な発現を保證する要素として、コード配列の末端に1つ以上の停止コドンの形の翻訳停止要素、または転写停止要素を配置することが可能である。

分泌を保證する要素としては、上記したように、分泌特性を変更または喪失することなしに、蛋白質PS1またはPS2の一方のシグナル配列のすべてまたは一部並びにこれら配列と等価の配列を挙げるができる。

最終的には、成突然変異のような公知の技術を用いて、同様の分泌特性を保持しながら分泌配列を僅かに変更することが可能であり、従って、本発明はこれら等価の配列をも含むものである。

結論として、本発明による発現系は他の要素、特に転写ターミネーター、例えば蛋白質PS1および/またはPS2用、もしくはgdhA用のターミネーターのような要素を含んでいてもよい。

場合によっては、発現および分泌配列に蛋白質PS1のすべてまたは一部を導入して、これらの条件の下で分泌および発現レベルを改善することのできる融合蛋白質を得ることも有利である。

本発明による発現系は、例えば、E. coli中で作

用する上記のような複製起源をコリネバクテリアと異なるバクテリア中で生成する異種要素、またCorynebacteriumへの転移を容易にする複製遺伝子のような他の要素を含んでいてもよい。

もちろん、マーカー遺伝子は、コリネバクテリア中で作用する限りにおいて、様々な形のものであってよく、耐性のような正または負の選択用の遺伝子であってよい。しかしながら、現在の研究状況の下では、これら遺伝子は容易に入手できない。従って、CMC⁺表現型を与えるClostridium thermocellumセルロース(celA)用のcelA遺伝子が好ましく使用されるが、他のマーカー遺伝子、特にE. coliのlacZを使用することも可能である。

マーカー遺伝子がcelAである場合、BstXIのような適切な制限部位へのコード配列の挿入後、CMC⁺特性のために形質転移バクテリアが選択される。

本発明の方法においては、特にマーカー遺伝子とコード配列との間に制限部位を配置することにより、構造の点検後にマーカー遺伝子を容易に除去できることが好ましい。

コード配列は自然のもの、合成のもの、またはこれらの混合したものでもよい。

本発明の発現および分泌系は、もちろん工業的に重要な生成物の生成を保證するように特別に設計されている。

従って、コード配列は、工業的に重要なペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を特別にコードする。しかしながら、このコード配列は、工業的に重要な蛋白質を直接的にコードするのではなくて、工業的に重要なアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の成熟および/または生成を必要とする蛋白質をコードする配列であってよい。

本発明の方法はアミノ酸配列、特に反復配列の発現のために特別に設計されており、従って、これらは主に合成配列である。

これら種々の生成物をコードするこの第二DNAは、また分泌生成物の成熟を保證するように設計された特定の要素を含んでいてもよい。

合成配列の場合、コード配列を選択することにより次の構成が得られる。

- アミノ酸配列:
- (a₁...a_x)_n型のn個の反復単位を有する反復アミノ酸配列;
- COOH-末端位置a_xに正または負に帯電したアミノ酸を含む反復配列。このアミノ酸は遺伝子発現を改善するが、次の事項を有利に達成し

(i) 著しいイオン性によりポリペプチドを単離すること;

(ii) 特定の蛋白質によりポリペプチドを(a₁...a_x)_n単位に切断すること;

(111) 必要ならば、特定のカルボキシペプチダーゼにより末端アミノ酸 $a a_x$ を除去すること；

— 所望の利点を与えるアミノ酸を NH_2 —または $COOH$ —末端部分 $a a_1$ または $a a_x$ に含有する反復配列。実施例において、発現配列は構造 $(a l a - g l n)_{20}$ および $(a l a - g l n - l y s)_{10}$ のポリペプチドをコードする。 $a l a - g l n$ または $a l a - g l n - l y s$ 配列はその後の酵素処理により放出することができる。酵素処理または化学的処理により放出できる $A l a - G l n - T y r$ または $A l a - G l n - M e t$ のようなこの種の他のポリマーを生成することもできる。

コード配列のコドンの選択は、コリネバクテリア中の発現に影響を及ぼし、約50-60%のGC含有量を有する配列を生成することが好ましい。

この例の場合、 $(A Q)_{20}$ をコードする配列は、 $G C X C A G$ であり、ここで X は A 、 T 、 C または G であり、実際これらコドンはアラニンに対して好ましくないが、一方 $C A G$ コドンはグルタミンに対して明らかに好ましい。この場合、GCの含有量は約75%であり、これは限定的である。従って、含有量を55%まで減少させるために、第3番目は A および T が豊富な3つのアミノ酸を含むポリマーの使用が考えられる。

$T y r$ 、 $L y s$ および $M e t$ はこれらコドンの最初の

と融合または別の方法で結合した所定の蛋白質を分離することも可能である。実際、 $P S 1$ および $P S 2$ は膜蛋白質であり、このシステムにより分泌した蛋白質の一部は、壁に固定したままであり、このことは、これら蛋白質の分離を容易にする。なぜならばバクテリアは特定の洗浄剤では溶菌しないからである。

プラスミドによるコリネバクテリアの形質転換は、エレクトロポレーション (Bonamy C., Guyonvarch A., Reyes, O., David F. および Leblon G. *PEMS Microbiology Letters*, 88, 283-270, (1990)) または他の好適な方法により行なうことが好ましい。

アミノ酸、ペプチドおよび/または蛋白質の生成を可能にする発酵条件は、得られた生成物の種類並びに使用した特定の菌株に明らかに依存し、当業者の知識に従って各菌株に対して明確に決定しなければならない要素がある。

また、本発明は、 $c s p 1$ 、 $c s p 2$ および $g d h A$ 、これら3つの遺伝子のすべてまたは一部の発現用シグナルのすべてまたは一部を含む発現系、並びにこの種の系を発現する菌株、特にコリネバクテリアの菌株に関する。

上記構成物を使用する方法において、所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現/分泌は、温度、培養液および/または $S P 1$ および $P S 2$ 用の糖分の性質、および塩（特に NH_4^+ ）の濃度、代謝産物（グルタミ

2つの塩基中に2つの A または T を有しており、従って、GCの含有量は75%から約60%に減少し、コリネバクテリア中に見られるGCの含有量に接近する。さらに、もちろん、グルタミン (Q) の $COOH$ —末端位置における工業的に重要なこれら2つのアミノ酸は、開発され且つ実在するものである。

本発明は、また上記発現および分泌系を含むコリネバクテリア菌株に関しており、特に、この場合、上記菌株は *Brevibacterium*、特に *Brevibacterium lactofermentum* 菌株である。

最後に、本発明は、アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質を生成する方法であって、上記コリネバクテリアの形質転換株を培養液中で培養することからなり、第二DNA配列が上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードし、且つ上記生成物が培養後に培養液から任意に分離されることを特徴とする方法に関する。実際、この方法により、有用な生成物が分泌された。従って、この生成物は、この生成物自体を公知の方法で単離することのできる培養液中に存在する。これら公知の方法は例えばクロマトグラフィーまたは選択的沈殿のような分離方法であり、この選択的沈殿は、生成する分子の特性に適合したものであることが明らかに必要である。

また、バクテリア濃縮液を分離し、つぎに、例えば表面活性剤を用いて、この濃縮液から $P S 1$ または $P S 2$

ン酸塩) および $g d h A$ を有する系用の糖分 (グルコース/フルクトース) によって調整される。

また、本発明は、 $S P 1$ または $P S 2$ 配列のすべてまたは一部を含む蛋白質、特にこれら蛋白質の1つ以上の抗原部位を含む蛋白質に関する。上記蛋白質は、また代表的な要素として、特に診断セットとして、対応する抗体と使用することができる。

また、本発明は、所定の蛋白質が下記固定作用を行なう $S P 1$ または $P S 2$ 部分の壁に固定され、また $S P 1$ または $P S 2$ の抗原エпитープが壁上に露呈されているコリネバクテリア菌株に関する。

下記の実施例は本発明の他の特徴および利点を示すことを意図しており、これら実施例は決して本発明を制限するものではない。

第1図はプラスミド $p C G L 6 1 2$ の図であり、このプラスミドは、蛋白質 $P S 1$ を合成する全 $c s p 1$ 遺伝子を含む *C. melassecola* ATCC 17965 の2.6-kb フラグメントを含む $p U N 1 2 1$ (Nilsson, B., Uhlen, M., Josephson, S., Gatenbeck, S. および Philipson, L. (1983), An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis (オリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発により生成された改良した正の選択プラスミドベクター), *Nucleic Acids Res* 11: 8019-8029) から誘

導されたものである。

第2図は、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965と呼ばれている*Corynebacterium glutamicum*のcsp1遺伝子のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。ヌクレオチドの番号は、図面の右側に記載されている。反復ヌクレオチド配列は四角で囲ってある。予想されるSD配列には下線が付してある。転写ターミネーターにおそらくは対応する24-bpパリンドローンは、向かい合う矢印で示されている。この配列は、アクセス番号X66078の下でEMBLヌクレオチド配列データベースで見ることができる。

第3図はcsp1をを保有する*C. melassecola* ATCC 17965の配列DNA領域の制限地図である。

第4図は、*C. glutamicum*の蛋白質PS1および*Mycobacterium*の抗原85複合体の蛋白質の配列の整理状態を示している。85B M. K. は*M. kansasii* (H1PSG18235)の抗原85-Bを表わす。85B M. b. は*M. bovis* (H1PSC88179)の抗原85-Bを表わす。85B M. l. は*M. leprae* (ENBLX80934)の抗原85-Bを表わす。85C M. t. は*M. tuberculosis* (ENBLX51229)の抗原85-Cを表わす。85A M. b. は*M. bovis* (H1PSA28544)の抗原85-Aを表わす。85A M. t. は*M. tuberculosis* (H1PSI60062)の抗原85-Aを表わす。配列は「Genetics Computer

ラスミドを示している。

ここでは、pCGL616から誘導したベクターの図、期待された蛋白質の大きさの明瞭、および抗PS1ポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロットによる検出(+)または非検出(-)を示している。

第8図はプラスミドpCGL1030の構造を示している。図の領域Aはcsp1およびこれに続くDNA領域を含んでおり、このDNA領域はPS1のシグナル配列およびその成熟配列の最初の30個のアミノ酸に対応している。

第9図はプラスミド1031の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。p s 1およびEGAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第10図はプラスミド1032の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。PS1、(A Q K) 10およびEGAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第11図はプラスミド1033の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。PS1、(A Q) 19およびEGAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第12図は、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965と呼ばれている*Corynebacterium glutamicum*

Group J (米国、ウイスクンシン大学)のFastAプログラムを用いて整理した。残基の数は各行の始めに各蛋白質に対して与えられている。異なる各蛋白質の間に見られる同様のアミノ酸残基は四角で囲ってある。同様であると考えられる残基は次の通りである。酸またはアミド(D, E, N, Q);塩基(H, K, R,);極性(P, A, G, S, T);無極性(I, L, M, V)および芳香族(F, W, Y)。7つの蛋白質の間の同じアミノ酸残基は、関係した残基の上の星印によって表示されている。

注意: 各抗原に対して、アクセス番号は上記データベースの名前と一緒にカッコ内に表示されている。

第5図はcsp1遺伝子の切断を示している。切断したcsp1遺伝子の染色体への組み込み状態が示されている。pCGL613は*C. glutamicum*中で複製不可能であり、これはaphA3遺伝子(Ks)によって切断されたcsp1(黒色領域)を含んでいる。wtは*B. lactofermentum* 15野生型を表わし、Δcsp1は切断csp1を含む組み込み体である。

第6図はプラスミドpCGL616の構造を示している。プラスミドpCGL616は、*C. glutamicum*のcsp1遺伝子を有するプラスミドpCGL125に対応する。

第7図は切形蛋白質PS1を合成することのであるブ

のcsp2遺伝子のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。ヌクレオチドの番号は、図面の右側に記載されている。予想されるSD配列には下線が付してある。転写ターミネーターにおそらくは対応する22-bpパリンドローンは、向かい合う矢印で示されている。

第13図はcsp2を保有する*C. melassecola* ATCC 17965の配列DNA領域の制限地図である。

第14図は*C. glutamicum*におけるcsp2遺伝子の切断を示している。切断された遺伝子の染色体組み込み状態が示されている。*C. glutamicum*中で複製不可能であるプラスミドpCGL830は、aphⅢにより切断されたcsp2遺伝子を保有している。aphⅢおよびcsp2遺伝子の転写方向は、プラスミドpCGL830上の矢印によって表わされている。Wtは*B. lactofermentum* 15菌株を表わし、csp2::aphⅢは切断csp2遺伝子を有する組み込み体である。

第15図は温度の間数としてPS1のトランスロケーションを示している。34℃の指数増殖期(OD650=1)における培養液の10mlを1分間³⁵Sメチオニン(37 TBq/μmol, 16nM最終濃度)で標識した。パルスの終了時に、クロラムフェニコール(100μg/ml)および次に³²Sメチオニン(最終濃度0.5mM)を加えた。アリコートの1mlを除去し、所定の温度まで

速やかに冷却した。この温度で30分間培養を続け、P S 1の分泌留分を抽出した。次に、この抽出物をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフにかけた(a)。バンドの強度は、デンシトメトリーにより決定され(b、左側の軸)且つ34℃で100を基準にして任意の単位で表わされている。トランスロケーションは膜脂質の相転移の関数である。

第16図はg d h A遺伝子の制限地図である。

第17図はC. melassecolaのg d h A遺伝子を含むNhe I-Blg Iフラグメントの完全な配列を示す。

第18図はp C G L 141およびp C G L 142の構造、およびg d h A遺伝子のプロモークとl a c Z遺伝子との間を融合するベクターを示す。

第19図は各構造において用いられるオリゴヌクレオチドを示す。

第20図はp P R O X (A Q) 20 c e l Aの構造を示す。

第21図はp t a cとc e l Aとの間に合成遺伝子が配置されている構造を詳細に示しており、a)はp t a cの指令下にc e l Aを配置した構造であり、b)はポリペプチドA Qの導入後の予想できる構造である。

p t a c: l a cプロモータ

R B S: リボソーム結合部位

■: ポリペプチドA Qに等価な配列の導入および

他の可能な遺伝子(D G F 1、D G F 2)との融合を可能にするc e l A遺伝子の5末端における合成配列

■: ポリペプチドA Qに等価なB a t X I部位に導入したヌクレオチド(D G F 5、D G F 6)

□: E G Aのシグナル配列の一部に等価なDNAの配列

▨: E G Aのコード配列に等価なDNAの配列

┐: 転写ターミネーター

P: E G Aのシグナル配列に属する最初のアミノ酸

第22図はp C G L 125の構造を示す。

実施例1. 培養液上澄みおよびCorynebacterium glutamicumの種におけるP S 1およびP S 2の同定

現在、Corynebacterium glutamicum菌株(Jones, D., およびCollins, M.D. (1988), Irregular nonsporing Gram-Positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, WilliamsおよびWilkins(eds), Baltimore, 2巻, 1261-1434頁)と再定義されているCorynebacterium melassecola A T C C 17965菌株の培養液上澄みの変性条件(SDS-PAGE)

(Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685)の下におけるリアクリルアミドゲル分析によれば、分子量がそれぞれ

約67000および63000のP S 1およびP S 2の2つの主要蛋白質が明示される。P S 1およびP S 2の濃度は、バクテリアの成長曲線に従い、これらの定常期において最大値に達する。これら蛋白質、特にP S 2の大部分の分泌留分は、バクテリアの壁中にも存在している。壁からP S 1およびP S 2を抽出するためには、バクテリアを殆ど溶菌することのないバクテリアのSDS処理が使用される。従って、P S 1およびP S 2の最大濃度を得るためには、2つの分泌留分、培養液上澄みおよび細胞壁留分を蓄積し、P S 1およびP S 2が高い割合で存在する最終濃品を得ることができる。ポリクロナール抗体はP S 1およびP S 2に対して生成され、2つの蛋白質間に免疫交差反応は存在せず、このことは、これら蛋白質が異なることを効果的に示している。P S 1およびP S 2との強い免疫交差反応性を有する蛋白質は、Brevibacterium lactofermentum 15(Bonnassie, S., Oreglia, J., Trautvetter, A., およびSicard, A.M. (1990), Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of Brevibacterium lactofermentum, FEMS Microbiol letter 72:143-148), Brevibacterium lactofermentum A T C C 21086およびBrevibacterium flavum A T C C 14067菌株のようなCorynebacterium melassecola A T C C 17965に関するバクテリア図

株の培養液上澄み中に見いだされた。P S 1およびP S 2は、インペルターゼ、ペクチナーゼ、ヌクレアーゼ、コラゲナーゼ、アミラーゼ、バクテリオシン、エンドグルカナーゼおよび広域スペクトルプロテアーゼ活性を含む幾つかの酵素活性についてテストされた。これらの酵素活性はP S 1またはP S 2に包含されていなかった。

実施例2. Escherichia coliにおけるP S 1のシグナルペプチドの作用についての証明(第1図)

プラスミドp C G L 612(第1図)により保持されたc a p l遺伝子E. coli T G 1中で発現されると、抗P S 1抗体とこの組換え体の粗抽出物のウェスタンブロット分析により、C. melassecolaの培養液上澄み中に存在する蛋白質P S 1と同じ分子量を有する主要蛋白質の存在が明らかになる。わずかに大きな分子量を有する少量の蛋白質もまた検出される。実際、主要な蛋白質バンドは、P S 1(シグナル配列を有せず)およびP S 1(シグナル配列を有する)の前駆体型に対する副次的蛋白質バンドに対応している。

実際、第1の実験において、浸漬ショック(Koppel, L.A., (1987), Selective release of enzymes from bacteria, Science 235: 1431-1433)により組換え菌株E. coli T G 1(p C G L 612)のペリプラズミック蛋白質(分泌した酵素)の放出および抗-P S 1抗体使用のウェスタンブロット法による放出蛋白質含有

量の検出は、主要蛋白質のみを示す。この菌株のイソクエン酸塩デヒドロゲナーゼ活性 (Shio, I., および Ujikawa, K. (1978), Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*, J. Biochem 84: 647-657) は、溶菌をモニターする方法で測定した。この実験において、この溶菌は1%未満であると見込まれた。このことにより、結論として主要蛋白質バンドはPS1の成熟型に対応し、且つこの蛋白質はE. coliの細胞膜を横切って放出される。

第2の実験において、組換え菌株E. coli TGI (pCRL612)の粗抽出物は、蛋白質の合成を抑制するためにクロラムフェニコールの添加の前後に抗-PS1抗体使用のウエスタンブロット法により分析された。副次的バンドは蛋白質合成の抑制後次第に消える。クロラムフェニコールCCCP (m-クロロフェニルヒドラゾンシアン化カルボニル)の添加5分前に、細胞膜を横切る移動力を消散させるプロトノフォア (Protonophore) が加えられるならば、この副次的PS1のバンドは消失しない。従って、副次的PS1のバンドの消失は、プロテアーゼによる分解の結果ではない。蛋白質合成の抑制後のその漸進的消失およびペリプラズムからのその不在は、膜内に位置されているペプチダーゼシグナル配列および細胞膜を横切るそのトランスロケ

ーションによるこの前駆体形態の成熟の仮説に一致している。また、この結果は、E. coliにおいて、PS1の成熟が生体内のプロトン移動力に依存していることも示している。

実施例3. PS1をコードするcsp1遺伝子のヌクレオチド配列

上流領域のcsp1と呼ばれているPS1-コード遺伝子を含む2547塩基対フラグメントの配列決定を行った。ヌクレオチド配列は第2図に示されている。(配列番号: 1)。第3図はこの配列領域の制限地図を表している。

コンピュータ分析を行なうことにより、657個のアミノ酸に対応する1971個の塩基対の読み取り枠が確認された。

翻訳 (GAG AAG GAA AACTTTCATG) および転写 (TACATA (-35) およびTAAGAT (-10))を開始する推定シグナルが確認された。上記リボソーム-結合部位から抽出したAG AAG GA配列は、グラム陽性型バクテリア、*Staphylococcus aureus* および*Streptomyces lividans*

(5'-GAUCACCUCCUUCUOH-3')のrRNAの3'末端部に対して相補的である (アンダーライン) (McLaughlin, J.R., Murray, C.L., および Rabinovitz, J.C. (1981), Unique features of the

ribosome-binding site sequence of the Gram positive *Staphylococcus aureus* β -lactamase gene, J. Biol. Chem. 256: 11283-11291) (Bibb, M.J. および Cohen, S.V. (1982), Gene expression in *Streptomyces*: Construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*, Mol Gen Genet 187: 265-277)。翻訳開始コドンの前方の5'におけるDNA領域は、2つのヌクレオチド配列AAAGTTATCCACAGおよびATTGAAA A Aを含んでおり、これら配列のそれぞれは、最初の場合28~42および70~84において、二度目の場合100~108および171~179において二度繰返されている。これら2つの配列はcsp1遺伝子の転写の調節範囲に含まれる。

分泌シグナルの場合、蛋白質のNH₂末端における配列は、グラム陽性型バクテリアのシグナル配列の特徴を表わしている (Watson, M.E.E. (1984), Compilation of published signal sequence, Nucleic Acids Res. 12: 5145-5164)。このシグナル配列は、NH₂-末端位置における過剰の正電荷 (最初の18個のアミノ酸中に正電荷を有する7個のアミノ酸)、それに続いて過剰の無極性アミノ酸 (次の23個のアミノ酸中に18個のアミノ酸)を有する配列、さらにそれに続くシグナル配列切断部位の2つの推定アミノ酸配列 (28-32の位置に

おけるpro thr ala ala) (39-43の位置におけるpro met ala ser ala)を含んでいる。シグナル配列切断部位のこれら推定アミノ酸配列の間で、後者の配列-39-43の位置におけるpro met ala ser alaは、最も確立が高いように思える。実際、蛋白質PS1は、2つの異なる方法 (実施例5を参照)を用いて電気泳動の結果が同じになるまで、*Corynebacterium glutamicum*の培養液上澄みから精製され、得られた機品は、エドマン分解法によりアミノ-末端配列を決定するために用いられた。5naolの純粋な蛋白質を使用した、シグナルは得られなかった。2つの精製方法が使用されたので、蛋白質PS1が生体内で過剰され、この過剰は使用した精製技術の結果ではないと思われる。提案された第2の切断配列は、成熟配列の最初のアミノ酸としてグルタミン (44の位置)を明示していると思われる、このグルタミンはエドマン技術によりビログルタミン酸に容易に変換されて、蛋白質のアミノ-末端配列化を不可能にする。

rho-依存型の推定ターミネーター部位は、3つの停止コドンoch-amb-opaから55個のヌクレオチドの遺伝子の3'領域中に見いだされる (Rosenberg, M., および Court, D. (1979), Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA

transcription. Annu Rev Genet 13: 319-353)。このヘナピン構造の ΔG は -35.7 kcal/mol に等しい。(Freier, S.M., Kierzek, R., Jager, J.A., Sugimoto, M., Caruthers, M.H., Neilson, T.およびTurner, D.H. (1986), Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. Proc Natl. Acad Sci, USA 83: 9373-9377)。

読み取り枠に含まれる657アミノ酸に対応する計算上の分子量は7087.4。しかしながら、最も可能性の高いシグナル配列(アミノ酸の42と43との間の切断部位)の分子量は4411であり、このことは成熟蛋白質に対して66463の計算上の分子量を与えられ、この値は、変性ポリアクリルアミドゲルに基づいて計算された67000の値にかなり近似している。

配列の特徴をまとめると、次の通りである：

239 ~ 244 T A C A T A (シグナル - 35)
269 ~ 274 T A A C A T (シグナル - 10)
405 ~ 414 G A G A A G G A A A リボソーム結合部位)
420 ~ 2390 コード配列
420 ~ 548 分泌蛋白のペプチドシグナル
2455 ~ 2506 ヘナピン構造、r h o-型のターミネーターシグナル

3123-3130.) (De Wit, L., De la Cuvellerie, A., Ooms, J., and Content, J. (1990) Nucleotide sequence of the 32 kDa-protein gene (antigen 85A) of *Mycobacterium bovis* BCG. Nucleic Acids Res 18: 3995.). *Mycobacterium bovis* Tokyo, *Mycobacterium kansasii* および *Mycobacterium leprae* の抗原 85-B (Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., and Yasuda, T. (1988) Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular antigen. J. Bacteriol 170: 3847-3854.) (Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., and Yasuda, T. (1990) Cloning and expression of the gene for the cross-reactive antigen of *Mycobacterium kansasii*. Infect Immun 58: 550-558.) (De Mendonca Lima, L., Content, J., Van Heuverswyn, H., and Degraeve, V. (1991) Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. Nucleic Acids Res 19: 5789). および *Mycobacterium tuberculosis* の抗原 85-C (Content, J., De la Cuvellerie, A., De Wit, L., Vincent-Levy-Frebault, V., Ooms, J., and De Bruyn, J. (1991) The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG

実験例4. *Corynebacterium glutamicum* の P S 1 と *Mycobacterium* の抗原 85 複合体の蛋白質との間の配列相関性 (図4図)

蛋白質 P S 1 の N H₂ 部分は、3つの分泌ミコプラチア抗原 85-A、85-B および 85-C にかなり類似している (Closs, O., Harboe, M., Aalsen-Christensen, N.H., and Magnusson, M. (1980) The antigens of *Mycobacterium bovis* strain BCG, studied by crossed immuno-electrophoresis: a reference system Scand J Immunol 12: 249-263.) (Viker, H.O., Harboe, M., Nagai, S., and Bennedsen, J. (1990) Quantitative and qualitative studies on the major extra-cellular antigen of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and *Mycobacterium bovis* BCG. Am Rev Respir Dis 141: 830-838.)。異なるミコプラチア種類の3つの対応する遺伝子がクローン化され且つ配列された。即ち、*Mycobacterium bovis* BCG 1173 P 2 および *Mycobacterium tuberculosis* の抗原 85-A (Borremans, M., De Wit, L., Volckaert, G., Ooms, J., De Bruyn, J., Huygen, K., Van Vooren, J.-P., Stelandre, M., Verhofstadt, R., and Content, J. (1989) Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 57:

are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. Infect Immun 59: 3205-3212.)。 *Corynebacterium glutamicum* の蛋白質 S P 1 は、同じ残数 $\sigma = 1.1$ の約 33% を有する) および約 330個のアミノ酸 (+/-5) の長さによってこれら6個の蛋白質を有する同様の残部 ($\sigma = 1.1$) の約 52%。約 330個のアミノ酸のこの長さは、ミコプラチア抗原の場合、蛋白質の全長に対応する。ちょうど P S 1 のように、すべてのこれらミコプラチア抗原は、グラム陽性菌バクテリア (約 42個アミノ酸、 $\sigma = 2.4$) 中に見いだされる最も長いシグナル配列に匹敵する長さのシグナル配列を含んでいる。ちょうど P S 1 のように、*M. bovis* の蛋白質 85-B および *M. tuberculosis* の蛋白質 85-C は、大部分のシグナル配列より長い親水性 N H₂ 領域 (5個以上の正に荷電した残基) を有する。すべてのこれらのシグナル配列の他の重要な特性は、グルタミン酸である *M. tuberculosis* の抗原 85-C を除いて、酸残基、即ちアスパラギン酸の3または5の位置に存在する。酸性荷電残基の存在は、Eucaryoticシグナル配列の N H₂ 端部に共通なものであるが、原核シグナル配列の N H₂ 端部に対して全く例外である。(Perlsan, D., and Halvorsen, H.O. (1983) A putative signal peptid

aserecognition site and sequence in eucaryotic and procaryotic signal peptides. J Mol Biol 167: 391-409.) (Watson, M.E.E. (1984) Compilation of published signal sequences. Nucleic Acids Res. 12: 5145-5164). この特徴の理由は知られていない。他の重要な類似点は、EMBL/MIPS データバンクに存在する P S 1 と他の蛋白質との間に見いだせない。

実施例 5. N 末端配列の決定に用いられる P S 1 及び P S 2 精製操作

操作 1:

タンパク質 P S 1 及び P S 2 をポリアクリルアミドゲルでの電気泳動及び電気泳出により C. グルタミカム A T C C 1 7 9 6 5 の培養上澄から精製した。

34℃において富 LB 培地 200 ml で培養された細菌を 4℃で 15 分間 8000 g で遠心することにより定常増殖期に収束した。次いで培養上澄のタンパク質を 60% 硫酸アンモニウムで沈降させ、4℃で 15 分間 13000 g で遠心することにより収束した。ペレットを pH 6.8 の 10 mM トリス HCl 緩衝液 4 ml に溶解し、しかる後溶液をこの同緩衝液中 4℃で 24 時間透析する。

硫酸アンモニウム沈降後に得られた透析タンパク質抽出液をフォーマット 16 × 20 × 0.75 cm の電気泳動ゲル上に沈着させる。電気泳動は 4% 濃縮用ゲル及び 7.5% 分離用ゲルを用いて Laemmli (1970) により記載

された操作に従い行う。泳動は 40 mA で 15 時間にわたる。次いでゲルを Lee (1987) により記載された操作に従い塩化銅で染色する。タンパク質 P S 1 及び P S 2 に相当するタンパク質バンドを切出し、しかる後完全に脱染する。次いでタンパク質を 4.8 M、4℃で 5 時間かけてゲルから電気泳出し、しかる後 pH 6.8 の 10 mM トリス HCl 緩衝液で数回透析してから、いくつかのアリコート分面に分け、-20℃で凍結する。精製収率は 90% 以上の純度で 25% 程度である。

操作 2:

タンパク質 P S 1 及び P S 2 を阻外透過、電気泳動及び P V D F 膜上での転写により C. グルタミカム A T C C 1 7 9 6 5 の培養上澄から精製する。

34℃において富 LB 培地で培養された細菌を 4℃で 15 分間 8000 g で遠心することにより定常増殖期に収束する。上澄 4 ml を pH 7.0 の 50 mM リン酸緩衝液で 50 倍希釈し、しかる後カットオフが 30 kD である限外透過膜で遠心する。このステップによれば 80 µl タンパク質抽出液を得ることが可能であり、しかる後これを 4% 濃縮用ゲル及び 7.5% 分離用ゲルからなる電気泳動ゲルに沈着させる。電気泳動は下記修正を加えて Laemmli により記載された操作に従い行う。ゲル及び泳動用緩衝液を調整するために用いられるすべての溶液を脱気させ、これらに 0.1 mM チオグリコレートを含ませ

る。更に、分離用ゲルを使用する前にブレランする。これらすべての予防処置はタンパク質の N 末端を変えて、ひいてはこの末端をブロックする可能性があるラジカルの形成をできるだけ避ける目的で行われる。電気泳動の終了後、タンパク質を P V D F 膜上に転写する。この操作は pH 8.0 の 50 mM トリス、50 mM ホウ酸緩衝液中 50 V、60 分間で行う。次いで膜を位置決定を可能にするアミドブラックで染色し、タンパク質 P S 1 及び P S 2 に相当するバンドを切出す。次いでそのタンパク質バンドを脱染して、それらを N 末端配列決定に用いた (Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 (バクテリオファージ T4 の頭部のアセンブリーにおける構造タンパク質の開裂). Nature, 227: 880-885; Lee, C., Levin, A., Branton, D. 1987. Copper staining: a five minute protein stain for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (銅染色: ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル用の 5 分間タンパク質染色). Anal. Biochem., 166: 308-312)。

実施例 6. P S 1 と呼ばれるものは P S 1 を合成しないコリネバクテリウム・グルタミカム株の産生 (図 5)

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム (Brevibacterium lactofermentum) 15 と称される C. グルタミカム株 (C. glutamicum) は大腸菌 K 12 の改変

DNA に対して許容的であり (Bonnassie, S., Oreglia, J., Trautvetter, A. 及び Sicard, A.M. (1990). Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of Brevibacterium lactofermentum (ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムの制限及び修正欠変異体の単離及び特徴化). FEMS Microbiol. Letters, 72: 143-146)、一方 C. メラッセコラ (C. melassecola) A T C C 1 7 9 6 5 と称される C. グルタミカム株は大腸菌の DNA に関して非常に制限的な株である (Reyes, O., Guyonvarch, A., Bonamy, C., Salti, V., David, F. 及び Lobion, G. (1991). 'Integron'-bearing vectors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive Corynebacteria (インテグロン・保持ベクター: 高制限コリネバクテリアにおける安定的染色体組込みに適した方法). Gene, 107: 81-88)。この理由から、B. ラクトファーマンタム 15 株を c s p 1 遺伝子の遮断を実施するために選択した。c s p 1 遺伝子の物理的地図は C. メラッセコラ A T C C 1 7 9 6 5 及び B. ラクトファーマンタム 15 の場合で同一であることが確かめられた。

カナマイシン耐性 (Km^r) を付与するストレプトコッカス・ファエカリス (Streptococcus faecalis) の a p h A 3 遺伝子を含むプラスミド p A T 21 の 1.5 kb C l a I 断片 (Trieu-Cuot, P. 及び Courvalin, P. (1983).

Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'-5'-aminoglycoside phosphotransferase type III (3'-5'-アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼタイプIII)についてコードするストレプトコッカス・ファエカリスプラスミド遺伝子のヌクレオチド配列) (Gene. 23:331-341) をプラスミド pCGL612 中に存在する csp1 遺伝子の独特な KpnI 部位 (A s p 718) に挿入して、プラスミド pCGL613 を得た。プラスミド pCGL613 を保有する組換え大腸菌株が実際に P S 1-表現型であることは抗 P S 1 ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより示された。このプラスミドは C. グルタミカムではなく大腸菌で典型的に複製する。それを電気的形質転換により B. ラクトファーメンタム 15 と称される C. グルタミカムの株に導入し (Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, P. 及び Leblon, G. (1990). Interspecies electro-transformation in *Corynebacteria* (コリネバクテリアにおける種間電気形質転換), FEMS Microbial Letters, 86:293-297), Km^r 形質転換株を選択した。Km^r 形質転換株において、プラスミド pCGL613 は宿主ゲノムの csp1 領域との相等的組換えにより C. グルタミカムの染色体中に組み込まれると思われる。形質転換株の 22.5% において二重組換え現象が生じて、形質転換株プラスミドの csp1

aphA3 組立体による野生型 csp1 遺伝子の置換を起こし、Km^r・Tet^r 表現型を与えた (図5)。BglII又はBamHI及びEcoRIのいずれかで切断された野生型株とKm^r・Tet^r 形質転換株の1つとの全染色体DNAをpCGL613プローブとのサザンブロッティングにより分析した (Saabrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a Laboratory manual (分子クローニング: 実験マニュアル), second edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publications)。csp1 遺伝子は野生型株で約 7.5 kb 断片に含まれ、一方組立体 pCGL613 は csp1 遺伝子中に挿入された 1.5 kbp aphA3 遺伝子に相当する約 9 kb 断片を含む。BamHI-EcoRI 切断から図5で示された組体の構造を確認する。

Km^r・Tet^r 組体を抗 P S 1 ポリクローナル抗体を用いて P S 1 の産生に関するウェスタンブロッティングでも分析した。この株の培養上清又は粗製抽出物のいずれにもタンパク質 P S 1 はない。これは λgt11 に組込んでクローニングされた csp1 遺伝子が C. グルタミカムで実際に P S 1 をコードする独特な遺伝子に相当することを確認させる。

この P S 1-C. グルタミカム株は完全に生存可能であり、その増殖速度は影響をうけないようである。この

結果は確率的にみて生存力に影響を与えることなく C. グルタミカム株中への相等的又は異種 DNA の組込み用のターゲットとして csp1 遺伝子領域を使用できることを示す。

実施例 7. マルチコピーで csp1 遺伝子の C. グルタミカム中における発現、その合成及びその分泌に必要な P S 1 の重要な領域の分析

この一連の実験のために、プラスミド pCGL616 を構築した。それは全 csp1 遺伝子を含んでおり、プラスミド pCGL125 から構築され、これは C. グルタミカムで複製でき、ストレプトコッカス・ファエカリスの aphA3 遺伝子を含むクローニングカセットを備えたプラスミド pBL1 (Santamaria, R., Gil, J.A., Mesas, J.M. 及び J.F. Martin (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum* (ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム)における内在プラスミドの特異化とクローニングベクター及び形質転換系の開発), J. Gen. Microbiol., 130:2237-2248) 及び大腸菌で複製でき、csp1 遺伝子を含むプラスミド pCSP1G に相当する。この組立てから得られるプラスミド pCGL616 (図6) は C. グルタミカムで複製できる。

C. グルタミカム P S 1-株における P S 1 合成の回復

P S 1 合成のいわゆる B. ラクトファーメンタム 15 P S 1-株における回復はプラスミド pCGL616 の後者への導入後に観察される。プラスミド pCGL616 を保有するこの B. ラクトファーメンタム 15 P S 1-株において、多量に分泌された P S 1 は野生型 B. ラクトファーメンタム 15 株 (天然 P S 1+) との比較により検出される。これは csp1 遺伝子のコピー数を増加させることにより C. グルタミカム株で分泌される P S 1 の濃度を増加させることを示す。

この結果はいわゆる C. メラッセコラ ATCC 17965 株でも証明される。

端部切り取り P S 1 タンパク質の合成を可能にする pCGL616 に由来するプラスミドの構築 (図7)

この実験は天然タンパク質に関する 67000 (Mv) の代わりに約 23000 (Mv) に相当する分子量の端部切り取り P S 1 タンパク質が C. グルタミカムでなお分泌されることを示す。

7 種の欠失をプラスミド pCGL616 から出発して csp1 遺伝子領域で行い、7 種の異なるプラスミドを得た。これらすべての欠失は P S 1 のシグナル配列に相当する DNA 領域と csp1 遺伝子の転写ターミネーターを保存している。すべての場合において、端部切り取り P S 1 タンパク質の合成及び分泌を抗 P S 1 ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析

した。これらの結果は *csp1* 遺伝子のほとんどを欠失しても、産物切りクタンパク質 *PS1* の合成及び分泌をなお可能であることを示している (図7)。この結果を許容する最大欠失は *csp1* 遺伝子の約 1.3 kb の *NcoI*・*BspEI* (*BspMI*) 断片の欠失に相当するが (*pCGL1041*)、これは分泌成熟形として約 29 kD 及び約 24 kD の *PS1* に関する前駆タンパク質サイズを与える。約 23 kD のタンパク質はこのプラスミド *pCGL1041* を保有するいわゆる B、ラクトファーマンタム 15 *PS1* 一株の培養上澄で抗 *PS1* 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより実際に検出される。

実施例 8. *csp1* 系に基づき *pCGL1030* と称される C、グルタミクムにおける発現及び分泌ベクターの構築 (図 8、9、10、11)

プラスミド *pCGL1030* の構築 (図 8)

C、グルタミクムで複製できるこのプラスミド (C、グルタミクムのプラスミド *pBL1* を含む) は、C、グルタミクムの *csp1* 遺伝子のプロモーターとシグナル配列に成熟 *PS1* 配列の最初の 30 アミノ酸を加えたものに相当するこの遺伝子の DNA 領域を保持している。マルチクローニング部位 (図 8 におけるポリリンカー 2) は、C、グルタミクムで発現されることを要するあらゆる非同期的遺伝子と同期して容易にクローニングさせる

り容易に検出できる (Cornet, P., Millet, J., Beguin, P. 及び J. P. Aubert (1983), Characterization of two *cel* (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases, *Bio/Technology*, 1:589-594)。この CMC 試験を C、グルタミクムにおける C、サーモセルムのタンパク質 *EGA* の合成を確認するために使用する。富培地 (LB・ルリアブロス又は BHI・脳心臓インフュージョン) 中全細胞又は培養上澄で実施されるディッシュでの活性に関する CMC 試験では、双方の場合においてプラスミド *pCGL1031* を保有する *プレバクテリウム・ラクトファーマンタム 15* と称される C、グルタミクム株のエンドグルカナーゼ活性を表す。より高い活性は LB + フルクトース又は + グルコース培地でみられ、これは *csp1* プロモーターの両面下での *celA* の発現へのこれら 2 種の糖の刺激効果を示している。これはザイモグラム (Bequin, P. (1983), Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo red stained agar replicas (コンゴレッド染色寒天レプリカを用いたポリアクリルアミドゲルでのセルラーゼ活性の検出), *Anal. Biochem.*, 131:333-336) 及び抗 *EGA* ポリクローナル抗体と共に培養上澄について行われるウェスタンブロッティングで確認される。

合成ポリペプチド (A Q K) 10 の発現及び分泌に関する

ため、成熟 *PS1* 配列の 30 番目のアミノ酸の直後において。結果的に、このプラスミドは分泌に必要な *PS1* の諸要素を備えており、したがって発現及び分泌双方の手段に対応している。

コリネバクテリウム・グルタミクムにおけるクロストリジウム・サーモセルムの *celA* 遺伝子の発現及び対応タンパク質の分泌 (図 9)

エンドグルカナーゼ A 又は *EGA* と称されるエンドグルカナーゼについてコードする C、サーモセルムの *celA* 遺伝子 (Cornet, P., Millet, J., Beguin, P. 及び J. P. Aubert (1983), Characterization of two *cel* (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases (エンドグルカナーゼについてコードするクロストリジウム・サーモセルムの 2 つの *cel* (セルロース分解) 遺伝子の特異化), *Bio/Technology*, 1:589-594) を *SmaI* 部位でベクター *pCGL1030* に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1031* を得た (図 9)。この *celA* 遺伝子は、キメラ構築の目的でタンパク質 *EGA* の翻訳開始部位の非常に近くに *BstXI* 制限部位を人工的に導入したプラスミド *pCGL1008* に由来する (図 10、11 参照)。タンパク質 *EGA* の合成は CMC と称されるエンドグルカナーゼ基質カルボキシメチルセルロースを用いたディッシュにおける酵素活性に関する染色試験によ

る *csp1* 系の使用 (図 10)

10 回反復されるポリペプチドアラニン・グルタミン・リジンに対応する合成遺伝子を化学的に合成し、プラスミド *pCGL1008* の *BstXI* 部位に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1017* を得た。プラスミド *pCGL1017* の *EcoRI* 断片を、シグナル配列の *csp1* プロモーター及び *PS1* の最初の 30 アミノ酸の下流 (及びリポーター遺伝子 *celA* の上流) に位置するプラスミド *pCGL1030* の *SmaI* 部位に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1032* を得た (図 10)。キメラタンパク質 *PS1*・(A Q K) 10・*EGA* の検出をディッシュ中での CMC 試験、ザイモグラム又はウェスタンブロッティングにより前記されたように行う。

合成ポリペプチド (A Q K) 19 の発現及び分泌に関する *csp1* 系の使用 (図 11)

20 回反復されるポリペプチドアラニン・グルタミンに対応する合成遺伝子を化学的に合成し、プラスミド *pCGL1008* の *BstXI* 部位に組込んでクローニングし、プラスミド *pCGL1002* を得た。プラスミド *pCGL1002* の *EcoRI* 断片を、シグナル配列の *csp1* プロモーター及び *PS1* の最初の 30 アミノ酸の下流 (及びリポーター遺伝子 *celA* の上流) に位置するプラスミド *pCGL1030* の *SmaI* 部位に組込

んでクローニングし、プラスミド pCGL1033 を得た (図11)。キメラタンパク質 PS1・(AQ)19・EGA の検出をディッシュ中での CMC 試験、サイモグラム又はウェスタンブロッティングにより前記されたように行う。プラスミド pCGL1033 中 B、ラクトフェリメンタムにおけるその配列はコード配列 AQ の喪失を示した (B、ラクトフェリメンタムでクローニング中 AQ₂₀ から AQ₁₉ への置換)。

この一連の実験では csp1 遺伝子のプロモーターがクロストリジウム・サーモセルムの異種 celA 遺伝子とキメラ構築 (AQK)10・celA 及び (AQ)19・celA を C、グルタミクム中で発現させることを示す。更に、これらの実験では PS1 の諸要素、この場合ではそのシグナル配列とその後の異種遺伝子の上流に位置する各成熟配列の最初の 30 アミノ酸、が対応産物を分泌させることを示す。培地の効果とこの培地への糖、この場合ではグルコース又はフルクトース、の添加又は非添加は対応産物の生産に影響を与える。特に、csp1 プロモーターの調節下 C、グルタミクム中において、EG A 又はキメラタンパク質 (AQK)10・EG A もしくは (AQ)19・EG A の産生は BHI 培地よりも LB 培地で高く、それは LB 培地においてグルコース又はフルクトースで高度に刺激される。C、グルタミクムの csp1 プロモーターは C、サーモセルムの天然 cel

1A プロモーターよりも強いことがわかる。実際に、天然 celA プロモーターを含むいわゆるプラスミド pCGL602 保有 B、ラクトフェリメンタム15株は、celA が C、グルタミクムの csp1 プロモーターの調節下にある、プラスミド pCGL1031 を保有するこの菌株よりも実質上小さなエンドグルカナーゼ活性を有する。

pCGL1032 又は pCGL1033 を含む異なる株の増殖上流について行われたウェスタンブロット実験では、いくつかのタンパク質バンドが抗 EGA ポリクローナル抗体と反応することを示す。これらの異なるバンドはエンドグルカナーゼ EGA に特異的であり (コントロールに不存在)、そのタンパク質及びキメラタンパク質の分解産物におそらく相当する。しかしながら、それより高い分子量のバンドも実際に (AQK)10・EG A (pCGL1032) 及び (AQ)19・EG A (pCGL1033) で密集して (Mv(AQ)19・EG A > Mv(AQK)10・EG A) 観察される。

実施例9. コリネバクテリウム・グルタミクムのタンパク質 PS2 についてコードする csp2 遺伝子のヌクレオチド配列 (図12、13)

vsp2 と称される PS2 をコードする遺伝子を含む 2702 塩基対断片とその上流領域の配列決定を行った。ヌクレオチド配列は図12に示される (配列番号 №2)。

図13はこの配列決定された領域の制限地図を表す。

コンピューター解析を用いて、1532塩基対断片が 510 アミノ酸に対応することを確認した。

シャイン・ダルガノタイプ配列 AAGGAC を翻訳開始コドンのすぐ上流で確認した (-12 ~ -17)。

そのタンパク質の NH₂ 末端においてグラム陽性菌の非常にありふれたシグナル配列が 30 アミノ酸で存在する。シグナル配列開始部位の推定アミノ酸配列 *ile pro ala phe ala* が発見された。コリネバクテリウム・グルタミクムの培養上液から精製されたエドマン分解技術によるタンパク質のアミノ末端配列の決定では、5naol の精製タンパク質を用いたけれども、シグナルが得られなかった。2つの精製操作を用いたため、タンパク質 PS2 は PS1 と全く同様にインビボでブロックされるが、そのブロッキングは用いられた精製技術の結果でないようである。30 アミノ酸に関して提案されたシグナル配列は成熟配列の最初のアミノ酸としてグルタミン (31位) を現すが、これはエドマン技術によるタンパク質のアミノ末端配列決定を不可能にするピログルタミン酸に容易に変換される。このタンパク質 PS2 はその非常に酸性の特性 (pI ~ 4.1)、そのシステイン残基欠如及びその非常に低いメチオニン残基含有率のような壁タンパク質の特徴を有する [Sleytr, U.B. (1978), Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls:

structure, chemistry, assembly and function (細菌細胞壁における高分子の規則的配列: 構造、化学、アセンブリ及び機能), Int. Rev. Cytol. 53:1-84] [Sleytr, U.B. 及び P. Messner (1983), Crystalline surface layers on bacteria (細菌上における結晶表面層), Ann. Rev. Microbiol., 37:311-339]。電子顕微鏡分析では PS2 が実際に細胞表面において組織化された六方晶構造で自ら配列できる壁タンパク質であることが確認されている。

α非依存性タイプの推定ターミネーター部位は停止コドンから 76ヌクレオチドでその遺伝子の 3' 領域においてみられる。

その配列の特徴は下記のとおりである:

562 ~ 567: リボソーム結合部位

579 ~ 2108: コード配列

579 ~ 668: 分泌タンパク質のシグナル配列

2188 ~ 2233: ヘアピン構造、α非依存性タイプの推定転写ターミネーターシグナル (停止コドンから 76ヌクレオチドに存在)

実施例10. PS2-と称されるもはや PS2 を合成しないコリネバクテリウム・グルタミクム株の産生 (図14)

vsp2 遺伝子の遮断は、aphIII の挿入により不活化された csp2 遺伝子のコピーを保持する、コリネバクテリアについての非複製的なベクター、ベクター p

CGL830 (図14) (プラスミドpCGL811により保持されるcsp2の独特なNruI部位にaphIII遺伝子を組込んだクローニング)によりB. ラクトファーマンタム15と称されるC. グルタミクムで行った。PS2シグナルはプラスミドpCGL830を保持した大腸菌T61株に由来する細胞抽出物についての抗PS2ポリクローナル抗体での免疫学的検出により示されなかった。組込まれたクローンはB. ラクトファーマンタム15株のエレクトロポレーション及びKmに関する選択により選択した。これら組込体のうち、遮断遺伝子により野生型遺伝子の置換を起こす二重置換現象を示すTet^rクローンを得た。

ブロープCGL811を用いたKm^rTet^rのXhoI及びSacI切断染色体DNAのサザンブロット分析は野生型株で得られる2.7kbXhoI及び0.7kbSacIの代わりに各々4.2kb及び2.2kbで断片を示すが、これはaphIII遺伝子の存在と過剰したサイズ増加を示す。

異なる分画において抗PS2ポリクローナル抗体でのウェスタンブロットニングによるPS2の検出の欠如は、B. ラクトファーマンタムにおけるcsp2遺伝子の遮断を確認させる。このPS2-株は完全に生存可能であり、決してその増殖に関し影響をうけない。csp1遺伝子を保持するC. グルタミクムの染色体の領域と同様

に、csp2遺伝子を保持するこのDNA領域も細菌の増殖に影響を与えることなく外来DNAの組込み用ターゲットとして使用できる。

B. ラクトファーマンタム15PS2-株におけるPS2+表現型の回復

全csp2遺伝子とその上流のDNA領域を含む2.3kbScal-FspI断片をプラスミドpCGL824に組込んでサブクローニングし、B. ラクトファーマンタム15PS2-株に再導入し、PS2+表現型を回復させた。より多量のPS2はその遺伝子がマルチコピーで存在する場合に得られることに留意すべきである。これらの結果はC. グルタミクムのcsp2遺伝子に由来する分泌産物の量がその遺伝子のコピー数に従い改変できることを示す。

クリオフラクチャー(cryofracture)により(前記技術により得られた)株PS2+及びPS2-のサンプルの電子顕微鏡分析は、タンパク質PS2が細胞表面において組織化された六方晶構造で目立的に配列できる壁タンパク質であることを非常に明確に示す。

実施例11. PS1の分泌に関する温度の効果(図15)

指数増殖期(34℃)における細菌を³⁵Sメチオニンで1分間かけて標識した。次いでクロラムフェニコール(100μg/ml)及び過剰量の冷メチオニン(³²S)を加えた(時間0)。次いで細胞懸濁液の温度を望ましい

温度まで速やかに調整し、インキュベートを上記温度で30分間続ける。PS1の移動をSDS-PAGE、オートラジオグラフィにより調べ、密度計測により定量する(図15)。PS1の移動は明らかに温度に依存している。移動は10℃以下で起きず、それはこの温度を超えて最大約30℃に達するまで急速に増加する。移動は脂質の相転移と相関している(図15)。

実施例12. コリネバクテリウム・メラッセコラの

A.T.C.C.17965に関する染色体DNAライブラリーの構築及びgdhA遺伝子のクローニング

C. メラッセコラの株A.T.C.C.17965の染色体DNAをAusubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds) [(1987) Current protocols in Molecular Biology(分子生物学における現行プロトコル), John Wiley and Sons, New York)により記載された方法に従い得た。制限エンドヌクレアーゼMboI [ベーリンガー(Boehringer)] による制限的切断をManiatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. [(1982) Molecular cloning: a laboratory manual(分子クローニング: 実験マニュアル), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)により記載された操作に従いこのDNA10μgで行った。DNA断片をAusubelら(1987)に記載されたようにスクロース勾配でそれらのサイズに従い分離した。サイズ6

〜15kbの断片をライブラリー構築用に選択した。

クローニングプラスミドpUN121 [Nilsson, B., Uhlen, M., Josephson, S., Gatenberg, S., Philipson, L. (1983) An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis (オリゴヌクレオチド媒介変異誘発により組立てられた改良陽性選択プラスミドベクター), Nucleic Acids Res. 11:8019-8030] をDr. B. Bachmann から自由に入手できる大腸菌の株GM2929から Birnboim, H.C., Doly, J. [(1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA (組換えプラスミドDNAをスクリーニングするための迅速なアルカリ抽出操作), Nucleic Acids Res. 7:1513-1523] の方法により得た。そのプラスミドを制限エンドヌクレアーゼBclI (ベーリンガー) で直鎖化した。

ライブラリーはBclIで直鎖化されたプラスミドpUN121 1μg及び前記6〜15kbDNA断片2μgの Ausubelら(1987)により記載された条件下におけるT4DNAリガーゼ(ベーリンガー)での結合により構築した。結合混合物はDover, V.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.V. [(1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation(高電圧電気穿孔法による大腸菌の高効率形質転換), Nucleic Acids Res. 16:8127-8145] により記載された操作に従いエレクト

ロポレーションより大腸菌株DH5中に導入した。組換えプラスミド陽性大腸菌クローンをテトラサイクリン100μg/ml含有LB培地上で増殖できるか否かにより直接選択した。全テトラサイクリン耐性クローンのプラスミドをBirnbois及びDoly(1979)の方法により得た。これらプラスミドの組合せはDNAライブラリーに相当する。

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を欠いた大腸菌株CLR207recA [Nattaf, J.V., McPherson, M.J., Votaw, J.C. (1982). Localization of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes (グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子におけるコード配列の強く保存されたセクションの局在化). FEBS Letters, 147:21-25] をC. メラッセコラATCC17965 DNAライブラリーで形質転換した。アンピシリン100μg/ml含有最少選択培地上で増殖できる大腸菌CLR207recAの形質転換クローンを選択した。このクローンは組換えプラスミドpCGL310を保持する。Meers, J.L., Teesest, D.V., Brown, C.M. (1979). Glutamine(amido):2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase(NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria (グルタミン(アミド) : 2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼオキシドレダクターゼ(NADP)、一部細菌によるグルタミン酸の合成に關与する酵素). J. Gen. Mi-

crobiol. 64:187-194] の方法に従い測定されるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性は、プラスミドpCGL310保持大腸菌株CLR207recAで回復される。種々のサブクローニングによって、第一に完全gdhA遺伝子を保持するC. メラッセコラのDNA断片をEcoRI及びXhoI制限部位により範囲限定される3.8kbDNA断片にまで短縮することができた。このEcoRI-XhoI断片の正確な制限地図は図16で表される。次のサブクローニングによって更に正確にgdhA遺伝子を2.2kbNheI-BglI断片にまで範囲限定することができた。Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis (ゲル電気泳動により分離されたDNA断片の中における特異的配列の検出). J. Mol. Biol. 98:503-517] の方法によるDNA-DNAハイブリッド形成は、クローン化DNA断片が実際にC. メラッセコラの株ATCC17965に由来することを示した。

gdhA遺伝子のヌクレオチド配列の決定

前記EcoRI-XhoI DNA断片のヌクレオチド配列の決定を実施するため、下記サブクローニングを行った：(1) EcoRI-BamHIで切断されたベクターM13mp18 [Norlander, J., Kempe, T., Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors us-

ing oligodeoxy-nucleotide directed mutagenesis (オリゴデオキシヌクレオチド指向性変異誘発を用いる改良M13ベクターの組立て). Nucleic Acids Res. 28:101-106] へのEcoRI-BglII、(2) XbaI-PstIで切断されたベクターM13mp18へのXbaI-PstI、(3) SalI-BamHIで切断されたベクターM13mp18へのXhoI-BglII、(4) EcoRI-PstIで切断されたベクターM13mp19 [Norlanderら, 1983]へのEcoRI-PstI。このため、EcoRI-XhoI断片に含まれるEcoRI-XbaI断片の完全ヌクレオチド配列は、Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors (鎖終結阻害剤によるDNA配列決定). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467] の方法により2本鎖で決定できる。gdhA遺伝子を含むNheI-BglI断片の完全配列は図17で表される(配列番号3)。

gdhA遺伝子のヌクレオチド配列の分析

NheI-BglI断片のヌクレオチド配列の分析から下記要素を確認することができる：

a) プロモーター(ヌクレオチド1~572)

gdhA遺伝子のプロモーターはそれが下記構造要素を含むことで特徴付けられる：

・ヌクレオチド251~266

σ60因子 [Merrick, M.J. (1983). Nitrogen control of the nif regulon in Klebsiella pneumoniae: involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA (肺炎桿菌におけるnifレギュロンの窒素コントロール：ntrA遺伝子の関連性とntrC及びnifA間の相似性). EMBO J. 2:39-44] により認識され及びアンモニウムにより調節されるプロモーターに特異的な配列TCG(Py)A(Pu)NNNTTCCAと類似性を示すシグナルGTGCATATCTGTGCG。

・ヌクレオチド437~442

ストレプトミセス種のプロモーターの-35領域に特徴的な配列TTGAC(Pu)と類似性を示すシグナルTTCACA [Strohl, V.R. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters (見掛け上ストレプトミセス科のプロモーターに關連するDNA配列の編集及び分析). Nucleic Acids Res. 20:961-974]

・ヌクレオチド466~471

ストレプトミセス種のプロモーターの-10領域に特徴的な配列TAG(Pu)(Pu)Tと類似性を示すシグナルTAGGAT [Strohl, 1992]

・ヌクレオチド558~572

ストレプトミセス種におけるリボソーム結合配列AAAGCA GGTGATCと類似性を示すシグナルGGGAACGAGGAATC [Stro-

hl.1992)

b) コード配列 (ヌクレオチド 573 ~ 1913)

573 ~ 1913 位にわたる読取枠は下記データからみてグルタミン酸デヒドロゲナーゼのそれに相当する:

・この読取枠から求められたタンパク質は447アミノ酸を含み、予想分子量48957ドルトンである。この分子量はC. メラッセコラの株ATCC17965のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ調製物の変性ゲル電気泳動後に観察されるポリペプチドの場合(48300D)と非常に近い。

・C. メラッセコラのgdhA遺伝子のヌクレオチド配列から求められたグルタミン酸デヒドロゲナーゼの一次構造は、他の生物由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの一次構造と強い類似性を有する [Teller, J.K., Smith, R.J., McPherson, M.J., Engel, P.C., Guest, J.R. (1992), The glutamate dehydrogenase gene of *Clostridium abyssi*: cloning by polymerase chain reaction, sequence analysis, and over-expression in *Escherichia coli* (クロストリジウム・シムボシクムのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子: ポリメラーゼ鎖反応によるクローニング、配列分析及び大腸菌内過剰発現), *Eur. J. Biochem.* 206:151-159]。

・グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性にとり必須であるとして Baker, P.J., Britton, K.L., Engel, P.C., Farrant

s, G.V., Lilley, K.S., Rico, D.V., Stillman, T.J. (1992), Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase (グルタミン酸デヒドロゲナーゼの構造中におけるサブユニットアセンブリ及び活性部位位置), *Proteins*, 12:75-88) により述べられたアミノ酸は、C. メラッセコラのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ中に存在し、これは Bakerら (1992) により記載された場合に相当する位置である。

・前記一次配列から求められるC. メラッセコラのグルタミン酸デヒドロゲナーゼの二次構造は他の生物のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの二次構造と強い類似性を示す (Tellerら, 1992)。

c) ターミネーター (ヌクレオチド 1937 ~ 1977)

gdhA 遺伝子のターミネーターはそれが下記構造要素を含むことで特徴付けられる:

$\Delta G = -13.6 \text{ kcal/mol}$ で GC ペアリングに富むヘアピン構造を形成できる配列 CCCTCATCCGCGTTAAGCTCAGCG とその後の T に富む配列 TTATTGATTTCTT。このような構造は p 非依存性ターミネーターに特徴的である (Rose, N.B., Court, D. (1979), Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription (RNA 転写の促進及び終結に与する調節配列), *Ann. Rev. Genet.* 13:319-353)。

C. メラッセコラのgdhA遺伝子の発現の調節

C. メラッセコラATCC17965のgdhA遺伝子の発現の調節はこの株が培養される培地の性質の関数としてグルタミン酸デヒドロゲナーゼ特異活性の変動を測定することにより研究された。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性は超音波処理で得られたC. メラッセコラの無細胞抽出物から Heersら (1970) の方法により測定した。

この研究に用いられた培地は、ベースが Liebi, V., Klammer, R., Schleifer, K.H. (1989), Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media (合成培地中コリネバクテリウム・グルタミクムの増殖に関するキレート化合物の要求), *Appl. Microbial. Biotechnol.* 32:205-210) により記載されたものである合成培地である。下記改変を加えた:

・炭素源は、最終11g/lでグルコース(培地1、2及び4)であるか又は10g/lでフルクトース(培地3)である。

・ NH_4^+ イオンの濃度は培地1、3及び4で125mMである。それは培地2で12.5mMである(NH_4^+ を制限する)。

・培地4は最終50g/lのL-グルタミン酸を含有する。

前記の異なる培地で培養されたC. メラッセコラ株ATCC17965のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに関して測定された特異活性は下記表に示される。その活性は形質転換された $\text{NADPH } 2 \mu\text{mol/min/mg}$ タンパク質で表されている。

培地	培地1	培地2	培地3	培地4
gdhA 特異活性	4.4 +/- 0.3	23.2 +/- 1.1	18.2 +/- 1.8	2.8 +/- 0.2

この表によってC. メラッセコラATCC17965のgdhA遺伝子の発現調節の下記3タイプを確認することができる。

・グルタミン酸による発現の抑制(倍率1.57)

・過剰アンモニウムによる発現の抑制(倍率5.27)

・グルコースによる異化抑制(フルクトースとグルコースとで倍率4.13)。異化抑制のケースにおいて、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニターゼ及びクエン酸シンターゼ酵素活性も影響をうけることに留意すべきである。

gdhA-lacZ融合ベクターの構築

グルタミン酸、過剰アンモニウム及びグルコースによるgdhA遺伝子の調節の転写特性をC. メラッセコラで調節して、これらの調節に付されないC. メラッセコラの変異株を簡単に選択しうる手段を有するために、gdhA遺伝子の翻訳開始用プロモーター及びATGコード

ンと、最初の5アミノ酸がlacZ遺伝子の領域から欠失された大腸菌のlacオペロンとの構築体を作製した。この融合は下記のように行った：

・gdhA遺伝子のプロモーターを含むEcoRI・BspHI断片の単離

・BspHI末端からプラント末端への変換

・EcoRI及びSmaIで直線化されたベクターpMCL1403 [Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, S.N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals (酵素活性 β -ガラクトシダーゼセグメントを外来タンパク質のアミノ末端断片に結合させるインビトロ遺伝子融合：翻訳開始シグナルの検出及びクローニングに関する大腸菌プラスミドベクター). J. Bacteriol. 143:971-980] に組み込まれて得られた断片のクローニングでプラスミドpCGL133を得る

・前記gdhAプロモーター・lacオペロン融合体を含むpCGL133のNheI・SalI断片の単離とSpeI及びSalIで直線化されたベクターpCGL241 [Reyes, O., Guyonvarch, A., Bonamy, C., Sallit, V., David, P., Leblond, C. (1991). "Integron" bearing vec-

ors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive Corynebacteria ("インテグロン"・保持ベクター：高制限コリネバクテリアにおける安定的染色体組込みに適した方法). Gene. 107:61-66] に組み込んだクローニング、こうしてプラスミドpCGL140を得る (図18)

・gdhA・lac融合体とカナマイシン耐性を付与するaphIII遺伝子を含むpCGL140から単離されたインテグロンのベクターpCGL125への導入によってpCGL141及びpCGL142を得る (図18)。プラスミドpCGL141及びpCGL142を形質転換でC. メラッセコラ株ATCC17965に導入した。gdhA・lac融合体の機能はpCGL141及びpCGL142で形質転換されたC. メラッセコラの株ATCC17965における β -ガラクトシダーゼ活性、即ちpCGL125で形質転換された同株に存在しない活性の検出により示された。 β -ガラクトシダーゼ活性は免疫原基質X・gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-ガラクトピラノシド) を含有する完全固形化培地 (BHI, ジフコ(Difco)) で細菌を培養することにより検出される。 β -ガラクトシダーゼ活性を有する細菌に由来するコロニーはこのように培地で青色になる。最終15g/lまで寒天を加えることで固形化され、最終25g/lまでカナマイシン及び

最終100g/lまでX・Galで補充された前記培地1、2、3及び4においてpCGL141及びpCGL142で形質転換された細菌を培養することにより、我々はこれら異なる培地で得られる細菌コロニーが酵素測定で示される調節と適合する青色勾配を有することからgdhA遺伝子の調節が真逆に転写タイプであることを示すことができた。実際に、培地4で得られるコロニーは強度増加順に培地1、3及び2で得られる場合よりも薄い青色である。我々はこの差異が培地1及び培地4においてpCGL141で形質転換されたC. メラッセコラの培養物に関する β -ガラクトシダーゼ活性の酵素測定レベルで反映されることを示した (グルタミン酸による抑制)。

培地	培地1	培地4
β -gal特異活性	0.118	0.052

β -ガラクトシダーゼ活性はC. メラッセコラの無細胞抽出物からMiller, J.H. (1972) (Experiments in molecular genetics (分子遺伝学における実験), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) により記載されたように測定した。

異化抑制で欠失した変異株の選択

C. メラッセコラATCC17965に由来する株のNTG変異誘発を実施した。この変異誘発から、第一の選択をグルタミン酸アナログ、4-フルオログルタミン

酸に対する耐性の基準に基づき適用した。このアナログに耐性の変異株は非異化抑制層を含めた異なる層に属するかもしれない。実際に、このような変異株において、グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特異活性に関する増加は細胞内グルタミン酸の過剰産生とひいては毒性アナログの希釈、したがって耐性の現象を起こすことが予想できる。4-フルオログルタミン酸耐性変異株を一緒に分類し、細胞の組合せをpCGL141での形質転換に付した。形質転換細胞をX・Gal及びカナマイシン含有固形培地1でプレート培養した。最も強度の青色を有する細菌コロニーを単離し、カナマイシン含有液体培地1で培養した。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を無細胞抽出物から測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性を全トルエン処理細胞から測定した (Miller, 1972)。選択された変異株の1つに関して得られた結果は以下で表される。

活性	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ	β -ガラク トシダーゼ
コントロール	8.3	10.79
変異株90	12.1	23.88

したがって得られた結果は、構築された手段でgdhA遺伝子調節に関する変異株の表現型スクリーニングにより選択できることを実際に示す。単純にカナマイシン選択圧の非存在下で培養することにより、選択後に細胞

から pCGL141 及び pCGL142 を除去することが非常に容易であることに留意すべきである。

実施例 13. ペプチドのクローニングを可能にするプラスミドの構築

この構築のため、celA サブクローニングステップを実施した。プロモーター領域、その遺伝子及びもう 1 つの未確認遺伝子の開始部分を含む 3.5 kb HindIII 断片の形で利用できる celA 遺伝子を、未知遺伝子断片から欠失された 2.6 kb HindIII-EcoRI 断片の形で大腸菌の複製ベクター pMTL23 に組み込んでサブクローニングした (Chambers, S.P., Prior, S.E., Barstov, D.A. 及び Minton, N.P. (1988). The pMTL cloning vectors. 1. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing (pMTL n1c - クローニングベクター, 1. ヌクレオチド配列決定のために音波処理 DNA の使用を容易にする改良 pUC ポリリンカー領域). Gene, 68:139-149)。

EcoRI 部位をその遺伝子の転写ターミネーターの直後に指向性変異誘発により導入した。この中間サブクローニングは、制限部位が導入されたとすれば、次のクローニングステップに必要である。特に、pMTL23 ポリリンカーに組み込むクローニングでは EcoRI 部位直後に NcoI 制限部位を導入できるが、これは Na

el-NcoI 断片の形で celA のコード領域を含む断片を除去することができる。このステップは 3' で未確認配列を欠く celA 遺伝子を有することも可能にする。

HindIII-EcoRI 断片の形における celA のクローニングを、大腸菌 TCG1 保存株を用いてプラスミド pMTL23 に組み込み実施した。このプラスミドを保有する大腸菌株は実際に EGA の発現に関連する CMC+ 表現型を保有する；得られた制限断片の分析は予想されたものと一致する。

pPROK-celA の構築 (図 20) は下記の通りである：

クロンテック・ラボラトリーズ社 (Clontech Laboratories, Inc.) (パロアルト, CA, USA) から入手できる 4.6 kb プラスミド pPROK-1 を用いる。

tac プロモーターを含む大腸菌で複製できるこのプラスミド (Brossius et al. Gene, 27:151, 1984) を EcoRI-NcoI で加水分解する。

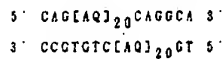
次いでこの制限中に EcoRI プラントの形で図 19 のアダプター DGF1/DGF2 を導入するが、これらのアダプターは BstXI 部位を形成する。次いで celA を前記構築体から NaeI (プラント)-NcoI の形で導入する。

こうして得られたプラスミドは pPROK-celA

と称される。それはアダプター DGF1/DGF2 により導入された BstXI 部位で分離される tac プロモーターの調節下で celA 遺伝子を含む。

実施例 14. マルチ A Q 配列の発現を可能にするプラスミドの組立て

20 Ala-Gln(AQ) 単位についてコードする配列の挿入を実施するため、DGF5/DGF6 と称される合成オリゴヌクレオチドの第二対を用いたが (図 19)、そのオリゴヌクレオチドは下記合成遺伝子に相当する：



(AQ) は Ala-Gln についてコードする配列を表す。

DGF5 及び DGF6 配列の末端は BstXI 部位と適合し、したがってその配列はこの部位でクローニングできる。

DGF5 及び DGF6 末端の配列は、一方でそれらがそのクローニング方向に向き、他方でそれらがクローニング後に BstXI 部位を壊すような配列である。

非リン酸化アダプターの使用によれば直列ないくつもの合成遺伝子の挿入をさせることができる。

BstXI による pPROK-celA (図 20) の切断及び合成遺伝子の結合後に、図 20 で表される構造を有する pPROK(AQ)₂₀celA が得られる。

図 21 は AQ/EGA 融合部位の構造を更に詳細に表

し、用いられる BstXI 部位の重要性を示す。この部位の構造は以下である：



それは ATG 開始コドンとアラニンコードコドン GCA 及び決められたコード配列の後にメチオニン挿入用の第二 ATG コドンを含むことが観察できる。

アダプター DGF5/DGF6 の挿入は一方のみで起き、関心ある対象にとり外来である塩基を導入しない。

このプラスミドを BamHI で処理し、同様に処理されたプラスミド pCGL125 の制限産物との結合により処理する。プラスミド pCGL125 (図 22) は複製起源 pBL1 を含むプレバクテリウム・ラクトファーマンタム 15 の機能的プラスミドである。

本発明による株はプラスミド (pCGL125-(AQ)₂₀-celA) (pCGL1002、図 11) の上記株の形質転換及び形質転換株の選択により得られる。

実施されたすべての融合において、翻訳は (AQ)₂₀直前のメチオニンで始まる；(AQ)₂₀を COOH 末端でメチオニンと隣接させる予防処置も払われる；タンパク質 celA と融合された又はそうでないポリペプチド AQ の検出は融合タンパク質の部分的精製と臭化シアニ加水分解又はその逆の後に特異性抗体により又は分析検出により実施できる。反復ペプチドの特異的性質は容易な分離を可能にする。

言及された株は下記記載である：

大腸菌

- ・ CLR207 recA B, バックマン (B. Bachman)
- ・ DH5α ギブコ BRL (Gibco BRL)
- ・ GM2929 B, バックマン
- ・ TGI パスツール研究所 (Institut Pasteur)

ブレビバクテリウム・フラブム

- ・ ATCC 14067 A T C C

コリネバクテリウム・グルタミカム (ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム)

- ・ 15 S, ボナシー (S. Bonassie)
- ・ ATCC 21088 A T C C

コリネバクテリウム・グルタミカム (コリネバクテリウム・メラッセコラ)

- ・ ATCC 17935 A T C C

DH5α株はクローンテック・ラボラトリーズ (the clonotech laboratories) のカタログ№C1021-1 (Palo Alto, CA, USA) から入手できる。

A T C C株は12301パークローン・ドライブ, ロックビル, MD20852, USAのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションc/oセールズ・アンド・マーケティング部門 (American Type Culture Collection c/o Sales and Marketing Department) から入手できる。

配列番号：1

配列の型：ヌクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ：2547塩基対

鎖の数：5'・3'方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebacterium jeikeium)

株名：A T C C 17965

直接の実験源：クローンpCSP10

配列の特徴

239-244 TACATA (signal-35) (S)

259-274 TAACAT (signal-10) (S)

405-415 GACAAGCAAAA リボソーム結合部位 (S)

420-2390 コード配列 (S)

420-548 分泌タンパク質ペプチド (S)

2455-2508 ヘアピン構造の依存性ターミネーターシグナル (S)

関連生物活性：コリネバクテリウム・メラッセコラ及びブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムの細胞外タンパク質P S 1の前駆体
ミコバクテリウムの細胞外抗原85複合体のタンパク質の前駆体のホモログ

株を1991年7月23日付でパスツール研究所 (パリのコレクション・ナショナル・デ・カルチャー・デ・マイクローガニズム (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) (CNCM) に寄託した。
・ №1-1126としてブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム15 (CGL2005 (B115))

AAGCTTCAAGGGGAAACAAGGGGCTTAAAAAGTTATCCACAGTCCGAAGTG 52
ATCCCGGCACTGGGGTGAAAAAGTTATCCACAGTAAGCGGAGGGGGCGGATTGA 104
AAATTCAGCGAAATGCGAAAGGTGGAGGGGAAATGCTGCGAGTCTTGCGG 156
ATTCCCGGCGTGGGCTTGAAAAAGTCTAAAGTTGAATTAAAGATTGAGGTC 208
ATTCTGAAGTTGTGACCTGATCAGAAGAGTTACATACCCACATATGTAACC 250
TTCTGGACTAAGATCAGCAGAGCTGAAAGAACTGAAGACTCTCAAGGCAT 312
AGCCCAAGTGTGTTTGTGGGCGGGAAGCGGCACTTTCGGGACGGATCTA 364
ACTCAATTGCGGGCTGTGCGGAGTATCCAAAAATCAAAATGAGAAGGAAAC 416
TTC ATG CGC GAC ACC GCA TTT CGT TCC ATC AAG GCT AAA 455
Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys
GCT CAG GGT AAG CGC CGT TCC CTC TGG ATT GCA GCA GGC 494
Ala Gln Ala Lys Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly
GCT GTC CCA ACC GCA ATT GCG TTG ACT ATG TCC CTG GCA 533
Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala
CCT ATG GGT TCG GGT CAG TCC AGC AAC CTT TCC TCT GAT 572
Pro Met Ala Ser Ala Gln Ser Ser Asn Leu Ser Ser Asp
GCC GTA GTT GGC AGC ATC GCG CAG GGC GTC ACC GAT GGC 611
Ala Val Val Gly Ser Ile Ala Gln Gly Val Thr Asp Gly
CTG ACT GAC TAC CTG AAG CCT CGC GTC GAA GAG CTT CCT 650
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Pro Arg Val Glu Glu Leu Pro
GCT GGT GAA GTC ACC TAC CCA GAG ATC GCG GGG CTG CCT 689
Ala Gly Glu Val Thr Tyr Pro Glu Ile Ala Gly Leu Pro
GAT GGT GTG CGC GTG ATC AGC GCT GAG TGG GCA ACC TCC 728
Asp Gly Val Arg Val Ile Ser Ala Glu Trp Ala Thr Ser
AAG CAT GTC ATT TTG ACT ATT CAG TCT GCA GCA ATG CCA 767
Lys His Val Ile Leu Thr Ile Gln Ser Ala Ala Met Pro
GAG CGC CCA ATC AAG GTG CAG CTG CTA CTT CCG GGT GAC 806
Glu Arg Pro Ile Lys Val Gln Leu Leu Leu Pro Arg Asp
TGG TAC TCT TCC CCG AAC CGT GAG TTC CCT GAA ATC TGG 845
Trp Tyr Ser Ser Pro Asn Arg Glu Phe Pro Glu Ile Trp
GCA CTT GAC GGT CTG CGC GCG ATT GAA GAG CAG AGT GGT 884
Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Glu Glu Gln Ser Gly

TGG ACC ATT GAG ACC AAC ATT GAG CAG TAC TAC GCC GAT	923	CAG GCG TTC CCT CAC ATC GCT AAC GCT CTT GGC ATG TCC	1586
Trp Thr Ile Glu Thr Asn Ile Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp		Gln Ala Phe Pro His Ile Ala Asn Ala Leu Gly Met Ser	
AAG AAC GCC ATT GTT GTG CTC CCA ATC GGT GGC GAG AGC	962	ACT GAG GAC CGT GGC GTT GAG TGT GCA CCT GTC GGC GCA	1625
Lys Asn Ala Ile Val Val Leu Pro Ile Gly Gly Glu Ser		Thr Glu Asp Arg Gly Val Glu Cys Ala Pro Val Gly Ala	
TCC TTC TAC TCT GAC TGG GAA GAG CCA AAC AAC GGC AAG	1001	ATC GCT GAC GCT GTT GGC GAC GGC GGC ATG GGC ACC TGC	1664
Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Glu Glu Pro Asn Asn Gly Lys		Ile Ala Asp Ala Val Ala Asp Gly Ala Met Gly Thr Cys	
AAC TAC CAG TGG GAG ACC TTC CTG ACT CAG GAG CTC GCA	1040	CTG ACC AAC GAA TAC GAT GTT ACC GGC GGT AAG GCC CAG	1703
Asn Tyr Gln Trp Glu Thr Phe Leu Thr Gln Glu Leu Ala		Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Val Thr Gly Lys Ala Gln	
CCG ATC CTG GAC AAG GGC TTC CGT TCC AAC ACC GAT CSC	1079	GAC TTC GCT AAC GGT CGC GCA TAC TGG TCT GCA AAC ACT	1742
Pro Ile Leu Asp Lys Gly Phe Arg Ser Asn Thr Asp Arg		Asp Phe Ala Asn Gly Arg Ala Tyr Trp Ser Ala Asn Thr	
GCC ATC ACC GGT ATC TCC ATG GGC GGT ACC GCT GCG GTT	1118	GGC GCT TTC GGC CTG GTT GGA CGC ATC AAC GCT CGT TAC	1781
Ala Ile Thr Gly Ile Ser Met Gly Gly Thr Ala Ala Val		Gly Ala Phe Gly Leu Val Gly Arg Ile Asn Ala Arg Tyr	
AAC ATC GCA ACC CAC CAC CCA GAC ATG TTT AAG TTC GTC	1157	TCT GAG CTG GGT GGA CCT GAC TCC TGG TTG GGC TAC CCA	1820
Asn Ile Ala Thr His His Pro Asp Met Phe Lys Phe Val		Ser Glu Leu Gly Gly Pro Asp Ser Trp Leu Gly Tyr Pro	
GGT TCC TTC TCC GGC TAT CTG GAC ACC ACC TCC GCT GGC	1196	ACC TCT TCT CAG TTG AAG ACA CCA GAC GGA GGT GGC CGC	1859
Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Asp Thr Thr Ser Ala Gly		Thr Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro Asp Gly Arg Gly Arg	
ATG CCA ATT TCT ATT TCC GCA GCC CTG GCA GGC GGC	1235	TTC GTC ACC TTC GAG CAC GGC TCC ATC TAC TGG ACC GGC	1898
Met Pro Ile Ala Ile Ser Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gly		Phe Val Thr Phe Glu His Gly Ser Ile Tyr Trp Thr Ala	
GGA TAC GAT GCC AAC GCA ATG TGG GGA CCA GTC GGT TCT	1274	ACC ACT GGT CCT TGG GAA ATC CCA GGC GAT ATG CTC GCC	1937
Gly Tyr Asp Ala Asn Ala Met Trp Gly Pro Val Gly Ser		Thr Thr Gly Pro Trp Glu Ile Pro Gly Asp Met Leu Ala	
GAG CGC TGG CAG GAA AAC GAT CCA AAG AGC AAC GTA GAC	1313	GCA TGG GGC ACC CAG GAC TAT GAG AAG GGC AGC CTC GGC	1976
Glu Arg Trp Gln Glu Asn Asp Pro Lys Ser Asn Val Asp		Ala Trp Gly Thr Gln Asp Tyr Glu Lys Gly Ser Leu Gly	
AAG CTC AAG GGC AAG ACC ATC TAC GTT TCC TCT GGT AAC	1352	TAC CCA ACC GGC GCC GCA GTT GAA TAC AAC GGT GGC CTG	2015
Lys Leu Lys Gly Lys Thr Ile Tyr Val Ser Ser Gly Asn		Tyr Pro Thr Gly Ala Ala Val Glu Tyr Asn Gly Gly Leu	
GGT GCA GAT GAC TTC GGT AAG GAA GAC TCT GTA GCT ATT	1391	CGC CAG CAG TTC GAA GGT GGC TAC GTA TTC GGT ACC TCC	2054
Gly Ala Asp Asp Phe Gly Lys Glu Asp Ser Val Ala Ile		Arg Gln Gln Phe Glu Gly Phe Tyr Val Phe Arg Thr Ser	
GCA CCT GCA AAC GCG ACA GGT GTC GGT CTG GAA GTT ATC	1430	AAT AAC CAG TCT TAC TGG GTT CGC GGA GAA ATC TCC AAG	2093
Gly Pro Ala Asn Ala Thr Gly Val Gly Leu Glu Val Ile		Asn Asn Gln Ser Tyr Trp Val Arg Gly Glu Ile Ser Lys	
TCC CGT ATG ACT TCC CAG ACC TTC GTC GAT CGT GCA AAC	1469	AAG TAC GGC GAT GAC GGA ATC TTC GCT CAG CTT GGT TTC	2132
Ser Arg Met Thr Ser Gln Thr Phe Val Asp Arg Ala Asn		Lys Tyr Ala Asp Asp Gly Ile Phe Ala Gln Leu Gly Phe	
CAG GCT GGC GTG GAA GTT GTT GCT ACC TTC CGT CCA TCC	1508	CCA ACC GGC ATT GAG AAG TTG ATC AAC GGT GGC GCT TTC	2171
Gln Ala Gly Val Glu Val Val Ala Ser Phe Arg Pro Ser		Pro Thr Gly Asn Glu Lys Leu Ile Asn Gly Gly Ala Phe	
GGC GTG CAC TCA TGG GAA TAC TGG CAG TTC GAG ATG ACT	1547	CAG GAA TTC GAA AAG GGC AAC ATC TAC TGG TCC GTG TCC	2210
Gly Val His Ser Trp Glu Tyr Trp Gln Phe Glu Met Thr		Gln Glu Phe Glu Lys Gly Asn Ile Tyr Trp Ser Val Ser	

ACT GGC GCG CAC GTG ATT CTG CAC GGC GAC ATC TTC GAC	2249
Thr Gly Ala His Val Ile Leu His Gly Asp Ile Phe Asp	
GCA TGG GGT GCT AAG GGC TGG GAG CAG GGC GAA TAC GGC	2288
Ala Trp Gly Ala Lys Gly Trp Glu Gln Gly Glu Tyr Gly	
TTC CCA ACC TCT GAC CAG ACC GCA ATC ACC GCG GGT GCA	2327
Phe Pro Thr Ser Asp Gln Thr Ala Ile Thr Ala Gly Gly	
CAG ACC ATT GAT TTC CAG AAC GGC ACC ATC CGT CAG GTC	2366
Gln Thr Ile Asp Phe Gln Asn Gly Thr Ile Arg Gln Val	
AAT GGC CGA ATT GAG GAG TCT CGC TAATAGTGA AGCGCATCTA	2409
Asn Gly Arg Ile Glu Glu Ser Arg	
CGCAACTCTCGCTTCGGGACTTTTGTGCTGAGCCTTGCTGCTTGTGGGGA	2461
GTCACTGTGTAAGGACATGATTCTCCCTCGACAGCGGCAGCCCAACAGAAA	2513
GCAGCGCTGGGTCAAGCAGCACCGCAAGGTGCGAC	2547

配列番号: 2

配列の型: ヌクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ: 2702塩基対

塩の数: 5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ゲノムDNA

起源

生物名: コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebacterium melassecola)

株名: ATCC 17965

直接の発露源: クローン pCGL815、pCGL824

配列の特徴

582-587 AAGCAGリボソーム結合部位 (S)

578-2108 コード配列 (S)

579-888 分泌タンパク質シグナルペプチド (S)

2188-2333 ヘアピン構造転写ターミネーターシグナル (S)

関連生物活性: コリネバクテリウム・メラッセコラ及び
プレバクテリウム・ラクトファーマンタムの壁の
外部表面層を構成するタンパク質と細胞外抗原 P S 2
の前駆体

GAATTCCTGTGAATTAGCCGGTTAGTACTTTTCAGGGGTGTCTATCTTAC	52	ATC ACC AAG ACC CGC GAG TCC GTT GCT TAC GCA CTC AAG	1001
CAGATCGTCAAGTTGTGGGTAGAGTCACCTGAATATTAAITGCACCCGACGG	104	Ile Thr Lys Thr Arg Glu Ser Val Ala Tyr Ala Leu Lys	
GTGATATATGCTTAITTTGCTCAAGTAGTTCCAGGTTAAGTGATTTTAGGTG	156	GTT GAC CAG GAA GGT ACC GCT GCT TTC GAG GCA TAC CGC	1040
AACAAATTTTTCAGCTTCGGGTAGAGACTTTCTATGCGCTTCAGAGCTTCTAT	208	Val Asp Gln Glu Ala Thr Ala Ala Phe Glu Ala Tyr Arg	
TAGGAAATCTGACACCACTTGATTAATAGGCTACCCCGAATGGGGGATG	260	AAC SCA CTT CGC GAT GCA GCT ATC TCT ATC AAC CCA GAT	1079
GGTCATTTTTGTGTGAAGGTAGTTTTCATGATATGACCTGCTTTATAA	312	Asn Ala Leu Arg Asp Ala Ala Ile Ser Ile Asn Pro Asp	
AGAAATGTAAACGTGATCAGATCGATATAAAAGAAACAGTTTGTACTCAGGT	364	GGC TCT ATC AAC CCA GAT ACC TCT ATC AAC CTA CTG ATC	1118
TTGAAGCATTTTCTCCGATTCCGCTGGCAAAATCTCAATTGCTCGTTACAG	416	Gly Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Ile Asn Leu Leu Ile	
TTTTTCTCAACGACAGGCTGCTAAGCTGCTAGTTCCGGTGGCTAGTGAGTGG	468	GAT SCT GCT AAC GCT GCT AAC CGC ACC GAT CGT GCA GAG	1157
CGTTTACTTGGATAAAAGTAATCCATGTGCTGATCAGCCATTTTGGGTTGT	520	Asp Ala Ala Asn Ala Ala Asn Arg Thr Asp Arg Ala Glu	
TTCCATAGCAATCCAAAGGTTTCGTCTTTTCGATACCTATTCAAGGAGCCTTC	572	ATC GAG GAT TAC GCT CAC CTT TAC ACC CAG ACC GAT ATT	1196
GGCTCT ATG TTT AAC AAC CGT ATC CGC ACT GCA GCT CTT	611	Ile Glu Asp Tyr Ala His Leu Tyr Thr Gln Thr Asp Ile	
Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu		GCT CTT GAA ACT CCA CAG CTT GCA TAC GCT TTC CAG GAC	1235
GCT GGT GCA ATC GCA ATC TCC ACC GCA GCT TCC GGC GTT	650	Ala Leu Glu Thr Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Asp	
Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val		CTG AAG GCT CTT CAG GCT GAG GTC GAC GCA GAC TTC GAG	1274
GTT ATC CCA GCA TTC GCT CAG GAG ACC AAC CCA ACT TTC	689	Leu Lys Ala Leu Gln Ala Glu Val Asp Ala Asp Phe Glu	
Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe		TGG TTG GGC GAG TTC GGA ATC GAC CAG GAA GAC GGT AAC	1313
AAC ATC ACC AAC GGC TTC AAC GAT GCT GAT GGA TCC ACC	728	Trp Leu Gly Glu Phe Gly Ile Asp Gln Glu Asp Gly Asn	
Asn Ile Thr Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr		TAC GTT CAG CGC TAC CAC CTC CGT GCT GTA GAG GCA CTC	1352
ATC CAG CCA GTT GGC CTT GTT AAC CAC ACC GAG GAA ACC	767	Tyr Val Gln Arg Tyr His Leu Pro Ala Val Glu Ala Leu	
Ile Gln Pro Val Gly Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr		AAG GCT GAG GTC GAC GCT CGC GTC GCA GCA ATT GAG CCA	1391
CTC CGC GAC CTG ACT GAC TCC ACC GGC GCT TAC CTG GAA	806	Lys Ala Glu Val Asp Ala Arg Val Ala Ala Ile Glu Pro	
Leu Arg Asp Leu Thr Asp Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Glu		CTT CGT GCA GAC TCC ATC GCT AAG AAC CTT GAG GCG CAG	1430
SAG TTC CAG AAC GGC ACC GTT GAG GAA ATC GTT GAA GCA	845	Leu Arg Ala Asp Ser Ile Ala Lys Asn Leu Glu Ala Gln	
Glu Phe Gln Asn Gly Thr Val Glu Glu Ile Val Glu Ala		AAG TCT GAC GTT CTG GCT CGC CAG CTC TTC CTC GAG CGT	1469
PAC CTG CAG GTT CAG GCT TCC GCA GAC GGA TTC GAT CCT	884	Lys Ser Asp Val Leu Val Arg Gln Leu Phe Leu Glu Arg	
Tyr Leu Gln Val Gln Ala Ser Ala Asp Gly Phe Asp Pro		GCA ACC GCA CAG CGC GAC ACC CTG CGT GTT GTA GAG GCG	1508
TCT GAG CAG GCT GCT TAC GAG GCT TTC GAG GCT GCT CGC	923	Ala Thr Ala Gln Arg Asp Thr Leu Arg Val Val Glu Ala	
Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Phe Glu Ala Ala Arg		ATC TTC TCT ACC TCT GCT CGT TAC GTT GAA CTC TAC GAG	1547
CTC CGT GCA TCC CAG GAG CTC GCA GCT TCC GCT GAG ACC	962	Ile Phe Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Val Glu Leu Tyr Glu	
Val Arg Ala Ser Gln Glu Leu Ala Ala Ser Ala Glu Thr		AAC GTC GAG AAC GTT AAC GTT GAG AAC AAG ACC CTT CGC	1586
		Asn Val Glu Asn Val Asn Val Glu Asn Lys Thr Leu Arg	
CAG CAC TAC TCT GCG CTG ATC CTT AAC CTC TTC ATC GCA	1625	GATAATCGGGTTAATGACTGCCCACTGCGGGAATCCGCAAGGCATCTGA	2347
Gln His Tyr Ser Ala Leu Ile Pro Asn Leu Phe Ile Ala		TTTGTTCAGCGGGTAAGTGGCGCAGAGCTTCTCGATCGGGAACCTGGCCCTG	2399
GCA GTT GCA AAC ATC AGC GAG CTC AAC GCT GCA GAT GCT	1664	CGCCCAAAATGAACCGGCGAGGATTAATCTCGAGGCGCGCTGCCCTG	2451
Ala Val Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala		TCAATGATGGTCTGGAACTTCCAAACCGGACCACTGACGCGCAACCTCGA	2503
GAA GCA GCA GCT TAC TAC CTC CAC TGG GAC ACC GAC CTC	1703	AGGTAGCTTCCGTGCCAGGCGCAGGCGCGGACGAGCCGACCGTACCGTT	2555
Glu Ala Ala Ala Tyr Tyr Leu His Trp Asp Thr Asp Leu		GATCGCAAGGAATCGGCTGCTTGGCTTGTACCGGCCACGACACCACTTGTAT	2607
GCA ACC AAC GAT GAG GAC GAA GCT TAC TAC AAG GCT AAG	1742	TCGAGAGCGAATTGCACACCAATCGCCGGTCAGTTCCTTGATTTCCTCCGCGAG	2659
Ala Thr Asn Asp Glu Glu Ala Tyr Tyr Lys Ala Lys		GATCCTCATCCTTGGAGTTGATCGTGTGGGTAGCTCCGAGCTC	2702
CTC GAC TTC CTT ATC GAG ACC TAC GCA AAG ATC CTG TTC	1781		
Leu Asp Phe Ala Ile Glu Thr Tyr Ala Lys Ile Leu Phe			
AAC GGT GAA GTT TGG CAG GAG CCA CTG GCT TAC GTC CAG	1820		
Asn Gly Glu Val Trp Gln Glu Pro Leu Ala Tyr Val Gln			
AAC CTG GAT GCA GGC GCA CTT CAG GAA GCA GCT GAC CGT	1859		
Asn Leu Asp Ala Gly Ala Arg Gln Glu Ala Ala Asp Arg			
CAG CCA GCT CGC GCA GCT GAC GAA GCT TAC CGC GCT GAG	1898		
Glu Ala Ala Arg Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Ala Glu			
CAG CTC CGC ATC GCT CAG GAA GCA GCT GAC GCT CAG AAG	1937		
Gln Leu Arg Ile Ala Gln Glu Ala Ala Asp Ala Gln Lys			
GCT ATC GCT GAG GCG CTT GCT AAG GAA GCA GGC AAC	1976		
Ala Ile Ala Glu Ala Leu Ala Lys Glu Ala Glu Gly Asn			
AAC GAC AAC TCC TCC GAC AAC ACG GAG ACC GGT TCT TCT	2015		
Asn Asp Asn Ser Ser Asp Asn Thr Glu Thr Gly Ser Ser			
GAC ATC GGA TCC TGG GGA CCT TTC GCA GCA ATT GCA GCT	2054		
Asp Ile Gly Ser Trp Gly Pro Phe Ala Ala Ile Ala Ala			
ATC ATC GCA GCA ATC GCA GCT ATC TTC CCA TTC CTC TCC	2093		
Ile Ile Ala Ala Ile Ala Ala Ile Phe Pro Phe Leu Ser			
GGT ATC GTT AAG TTC TAA TTTCGACCGAGATAGCTAAAAGTTAAA	2139		
Gly Ile Val Lys Phe			
CCACCTCCTTTCTTCCGGGAGGTGGTTTTTCCCTTGGCTAACGACCAAAA	2191		
GAAGAGCCACCTCTCTCAAGGAGGTGGCTTATCTTTTATTACTGGG	2243		
GAGCCGAGGTTGGCGTCGATAAGCAAJAATCTTTTCTTTAAGGAAAGCT	2295		

配列番号: 3

配列の型: スクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ: 2160塩基対

鎖の数: 5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ゲノムDNA

起源

生物名: コリネバクテリウム・メラッセコラ (*Corynebacterium melassecola*)

株名: ATCC 17965

直接の複製源: クローン pCGL315、pCGL313、pCGL310

配列の特徴

因子60により認識され及びアンモニウムにより調節される251-266 TGGTCATATCTGTCCGプロモーター部位 (S)

437-442 TTCACAプロモーターシグナル領域-35 (S)

466-471 TAGCATプロモーターシグナル領域-10 (S)

558-572 GGGAACGAGGAAATC リボソーム結合部位 (S)

573-1913 コード配列 (S)

1937-1977 ヘアピン構造の非放射性転写ターミネーターシグナル (S)

関連生物活性: 48300dポリペプチドとして変性ゲルで

泳動するNADPH依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性

TCC GAC TTC GAC CCT AAG GGC AAG TCC GAT CTG GAA ATC 1001
 ser asp phe asp pro lys gly lys ser asp leu glu ile
 ATG GGT TTC TGC CAG TCC TTC ATG ACC GAG CTG CAC GGC 1040
 met arg phe cys gln ser phe met thr glu leu his arg
 CAC ATC GGT GAG TAC CGC GAC GTT CCT GCA GGT GAC ATC 1079
 his ile gly glu tyr arg asp val pro ala gly asp ile
 GGA GTT GGT GGC CGC GAG ATC GGT TAC CTG TTT GGC CAC 1118
 gly val gly gly arg glu ile gly tyr leu phe gly his
 TAC CGT CGC ATG GCC AAC CAG CAC GAG TCC GGC GTT TTG 1157
 tyr arg arg met ala asn gln his glu ser gly val leu
 ACC GGT AAG GGC CTG ACC TGG GGT GGA TCC CTG GTC CGC 1196
 thr gly lys gly leu thr trp gly gly ser leu val arg
 ACC GAG GCA ACT GGC TAC GGC TGC GTT TAC TTC GTG AGT 1235
 thr glu ala thr gly tyr gly cys val tyr phe val ser
 GAA ATG ATC AAG GCT AAG GGC GAG AGC ATC AGC GGC CAG 1274
 glu met ile lys ala lys gly glu ser ile ser gly gln
 AAG ATC ATC GTT TCC GGT TCC GGC AAC GTA GCA ACC TAC 1313
 lys ile ile val ser gly ser gly asn val ala thr tyr
 GCG ATT GAA AAG GCT CAG GAA CTC GGC GCA ACC GTT ATT 1352
 ala ile glu lys ala gln glu leu gly ala thr val ile
 GGT TTC TCC GAT TCC AGC GGT TGG GTT CAT ACC CCT AAT 1391
 gly phe ser asp ser ser gly trp val his thr pro asn
 GGC GTT GAC GTG GCT AAG CTC CGC GAA ATC AAG GAA GTT 1430
 gly val asp val ala lys leu arg glu ile lys glu val
 CGC CGC GCA CGC GTA TCC GTG TAC GCC GAC GAA GTT GAA 1469
 arg arg ala arg val ser val tyr ala asp glu val glu
 GGC GCA ACC TAC CAC ACC GAC GGC TCC ATC TGG GAT CTC 1508
 gly ala thr tyr his thr asp gly ser ile trp asp leu
 AAG TGC GAT ATC GCT CTT CCT TGT GCA ACT CAG AAC GAG 1547
 lys cys asp ile ala leu pro cys ala thr gln asn glu
 CTC AAC GGT GAG AAC GCT AAG ACT CTT GCA GAC AAC GGC 1586
 leu asn gly glu asn ala lys thr leu ala asp asn gly
 TGC CGT TTC GTT GCT GAA GGC GCG AAC ATG CCT TCC ACC 1625
 cys arg phe val ala glu gly ala asn met pro ser thr

GCTAGCCTCGGGAGCTCTAGGAGATTGTGAAAACGGGTCAAATTTCTCGGA 52
 TGCAGCGCCTATAAAAGTCGTACCAATTCATTTGAGGGTGCTCAAGTGTCG 104
 CCAGGTTATATAACCAAGTCAGTCAACTGGTCTCATTTCGGTGGTCGATGAAT 156
 TTAATTAAGAGAGAGACTTCATGCAATACCGCGGCTTTTGGCGATACACAA 208
 TTGATAAACCTTAAGGAAATTTTCAACCAATTTTAATTTCTTTGGTCATATC 260
 TGTGCGACACTGCCATAATGAACGTGAGCATTTACAGCGCTAAATGCCCGC 312
 AGTGAGTTAAGTCTCAAAGCAAGAAGTGTCTTTAGGGCATCCGTAGTTTA 364
 AAACATTAAACCGTTAGGTATGACAAGCGGTTGATGTGAACGCAAGTTTITA 416
 AAAGTTTCAGGATCAGATTTTTCACAGGCATTTTGCTCCAGCAACGCCATAG 468
 GATGTACATGGTGCCTCAATGGGAACCAACATCACTAAATGGCCGAGA 520
 TACACACTTTAAATCGTGGCGCATGACGCGGAGATGGGAACGAGGAAATC 572
 ATG ACA GTT GAT GAG CAG GTC TCT AAC TAT TAC GAC ATG 611
 met thr val asp glu gln val ser asn tyr tyr asp met
 CTT CTG AAG CGC AAT GCT GGC GAG CCT GAA TTT CAC CAG 650
 leu leu lys arg asn ala gly glu pro glu phe his gln
 GCA GTG GCA GAG GTT TTG GAA TCT TTG AAG ATC GTC CTG 689
 ala val ala glu val leu glu ser leu lys ile val leu
 GAA AAG GAC CCT CAT TAC GCT GAT TAC GGT CTC ATC CAG 728
 glu lys asp pro his tyr ala asp tyr gly leu ile gln
 CGC CTG TGC GAG CCT GAG CGT CAG CTC ATC TTC CGT GTG 767
 arg leu cys glu pro glu arg gln leu ile phe arg val
 CCT TGG GTT GAT GAC CAG GGC CAG GTC CAC GTC AAC CGT 806
 pro trp val asp asp gln gly gln val his val asn arg
 GGT TTC CGC GTG CAG TTC AAC TCT GCA CTT GGA CCA TAC 845
 gly phe arg val gln phe asn ser ala leu gly pro tyr
 AAG GGC GGC CTG CGC TTC CAC CCA TCT GTA AAC CTG GGC 884
 lys gly gly leu arg phe his pro ser val asn leu gly
 ATT GTG AAG TTC CTG GGC TTT CAG CAG ATC TTT AAA AAC 923
 ile val lys phe leu gly phe glu gln ile phe lys asn
 TCC CTA ACC GGC CTG CCA ATC GGT GGT GGC AAG GGT GGA 962
 ser leu thr gly leu pro ile gly gly gly lys gly gly

CCA GAG GCT GTT GAG GTC TTC GGT GAG CGC GAC ATC CGC 1664
 pro glu ala val glu val phe arg glu arg asp ile arg
 TTC GGA CCA GGC AAG GCA GCT AAC GCT GGT GGC GTT GCA 1703
 phe gly pro gly lys ala ala asn ala gly gly val ala
 ACC TCC GCT CTG GAG ATG CAG CAG AAC GCT TCG CGC GAT 1742
 thr ser ala leu glu met gln gln asn ala ser arg asp
 TCC TGG AGC TTC GAG TAC ACC CAG GAG CGC CTC CAG GTG 1781
 ser trp ser phe glu tyr thr asp glu arg leu gln val
 ATC ATG AAG AAC ATC TTC AAG ACC TGT GCA GAG ACC GCA 1820
 ile met lys asn ile phe lys thr cys ala glu thr ala
 GCA GAG TAT GCA CAC CAG AAC GAT TAC GTT GTC GGC GCT 1859
 ala glu tyr gly his glu asn asp tyr val val gly ala
 AAC ATT GCT GGC TTC AAG AAG GTA GCT GAC GGC ATG CTG 1898
 asn ile ala gly phe lys lys val ala asp ala met leu
 GCA CAG GGC GTC ATC TAA GACCCGTGACCTTACTTAAACCCCTGA 1944
 ala gln gly val ile och
 TCCGCGTTAAGGATCAGGATTTTGTATTTCTTCAGGTCATTAATCCGATC 1996
 CACATGGGTTAATGCACTGTGCGGTGCGCAATGATGATCAGCTGGTGCT 2048
 TTAAGCGTGCGCAGAGTCTGGGAAGATCCGCTTGATTACCGCATCTGGT 2100
 GGTGCTGCGCTTCATCGACAATCACTACCTGACGGGTGCTGCCAAGCAGC 2152
 CCCCAGGCGAGCGCGTGTGTCTGTCGCGCAGATAGGC 2190

図面中の符号

図 8 :

A - p : c s p 1 のプロモーター
 s : 推定 c s p 1 シグナル配列
 m : 成熟 P S 1 の最初の 30 アミノ酸

図 9 :

A - p : c s p 1 のプロモーター
 s : 推定 c s p 1 シグナル配列
 m : 成熟 P S 1 の最初の 30 アミノ酸

5' から 3' への配列の詳細

ACACCGCATTTTGGTTCCATCAAGGCTAAAGCTCAGGCTAAGCGCGTTCCG
 TCTGGATTGACGAGGCGGCTGTCCCAAGCGCAATTGCGTTGAGTATGTCCG
 TGGCAGCTATGGCTTCGGCTCAGTCCAGCAACCTTTCCTCTGATGCCGTAG
 TTGGCAGCATCGCGCAGGCGGTACCGATGGGCTGAGTACCTGAAAG
 CCTTGGCTGAAAGACCTGCGAGCCAAATTCATGGCAATGGCGGCTGTGG
 ACCCGGGUAAACACTGTGTGAGCGGCGAGGTGTGCTTTTAACACAAATAC
 CCGTATGGTCTACTTCTATTGCGGATAATCAGTCGGAAGTAAGTGAATG
 CTCGAAGCAGAAATGGGAAGACTGGAAGAGCAAGAGAAATACCTCGAACGGT
 GCAGGAGGATA

図 10 :

A - p : c s p 1 のプロモーター
 s : 推定 c s p 1 シグナル配列
 m : 成熟 P S 1 の最初の 30 アミノ酸

5' から 3' への配列の詳細

CCCTTCCTCTGATGCCGTAGTTGGCAGCATCGCGCAGGCGGTACCGATGG
 CCTGACTGACTACCTGAAGCCTCGCGTCCGAAGACCTGCAGCCCAATTCAT
 GGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACA
 GAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCACAGAAGGCAG
 CTTGTGACCCCGGCAAAACACTGTGTGAGCGGCGAGGTGTG

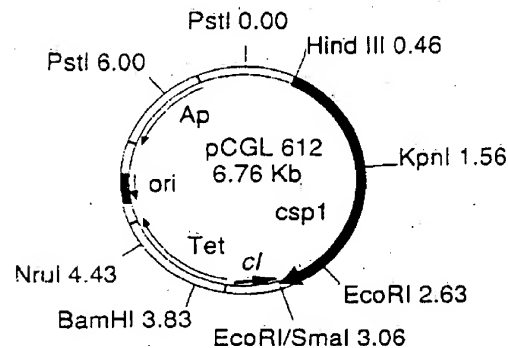


FIG. 1

図 11 :

A - p : c s p 1 のプロモーター
 s : 推定 c s p 1 シグナル配列
 m : 成熟 P S 1 の最初の 30 アミノ酸
 5' から 3' への配列の詳細

CCCTTCCTCTGATGCCGTAGTTGGCAGCATCGCGCAGGCGGTACCGATGG
 CCTGACTGACTACCTGAAGCCTCGCGTCCGAAGACCTGCAGCCCAATTCAT
 GGCACAGGCACAGGCTCAGGCCAGGCACAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGC
 CCAGGCTCAGGCACAGGCCAGGCCAGGCCAGGCACAGGCACAGGCTCAGGCCA
 GGCTCAGGCTCAGGCAATGGCGGCTGTGACCCCGGCAAAACACTGTGTG
 AGCGGCAGGT

図 22 :

ポリリンカー 1 : 0.001/SacII, BstXI, NotI, XbaI.
 ポリリンカー 2 : 1.521/ClaI, SalI, AatI, HinfI, NcoI.
 BglII, XhoI, StuI, PstI, SmaI, BamHI, SpeI.
 ポリリンカー 3 : 1.561/XbaI, NotI, SacII, BstXI.

AAGCTTCAAGGGGAAAAACAAGGGCCTAAAGTTATCCACAGATCCGAAGTG 52
 ATCCGCGCACTGGGCTGAAAGTTATCCACAGATCCGAAGGGGCGGATTTGA 104
 XXXXTCAGCGAAATGCGAAAGGTGGAGCGGAAATGCTGGGAGTCTTGGCG 156
 ATTCCGCGGCTGGCTTGAAGAAAGTCTAAAGTTGAACCTTAAGATTGAGTGC 208
 ATTCTGAAGTTGTGACCTGCATCAGAAGAGTTACATACCCACATATTAACC 260
 TTCTGGACTAAGATCAGCAGACTGAAAGAACTGAAGACTCTCAAGGCAT 312
 AGCCCACTGTGTGTTCGCGGCGGAAAGCGGGGAATTTTCGGACGGATCTA 364
 ACTCATTCGCGGCGGTGCGGCAATATCCAAAATCAAAATGGAAGGAAAC 416
 TTC ATG CGC GAC ACC GCA TTT COT TCC ATC AAG GCT AAA 455
 Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys
 GCT CAG GCT AAG CGC COT TCC CTC TGG ATT GCA GCA GGC 494
 Ala Gln Ala Lys Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly
 GCT GTC CCA ACC GCA ATT GCG TTG ACT ATG TCC CTG GCA 533
 Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala
 COT ATG GCT TCG GCT CAG TCC AGC AAC CTT TCC TCT GAT 572
 Pro Met Ala Ser Ala Gln Ser Ser Asn Leu Ser Ser Asp
 GGC GTA GTT GGC AGC ATC GCG CAG GGC GTC ACC GAT GGC 611
 Ala Val Val Gly Ser Ile Ala Gln Gly Val Thr Asp Gly
 CTG ACT GAC TAC CTG AAG COT CCG GTC GAA GAG CTT COT 650
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Pro Arg Val Glu Glu Leu Pro
 GCT GGT GAA GTC ACC TAC CCA GAG ATC GGC GGC CTG COT 689
 Ala Gly Glu Val Thr Tyr Pro Glu Ile Ala Gly Leu Pro
 GAT GGT GTC CGC GTG ATC AGC GCT GAG TGG GCA ACC TCC 728
 Asp Gly Val Arg Val Ile Ser Ala Glu Trp Ala Thr Ser
 AAG CAT GTC ATT TTG ACT ATT CAG TCT GCA GCA ATG CCA 767
 Lys His Val Ile Leu Thr Ile Gln Ser Ala Ala Met Pro
 GAG CGC CCA ATC AAG GTG CAG CTG CTG CTT CCG COT GAC 806
 Glu Arg Pro Ile Lys Val Gln Leu Leu Leu Pro Arg Asp
 TGG TAC TCT TCC CCG AAC COT GAG TTC COT GAA ATC TGG 845
 Trp Tyr Ser Ser Pro Asn Arg Glu Phe Pro Glu Ile Trp
 GCA CTT GAC GGT CTG CCG GCG ATT GAA GAG CAG AGT GGT 894
 Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Glu Glu Gln Ser Gly

FIG.2 (1ere planche)

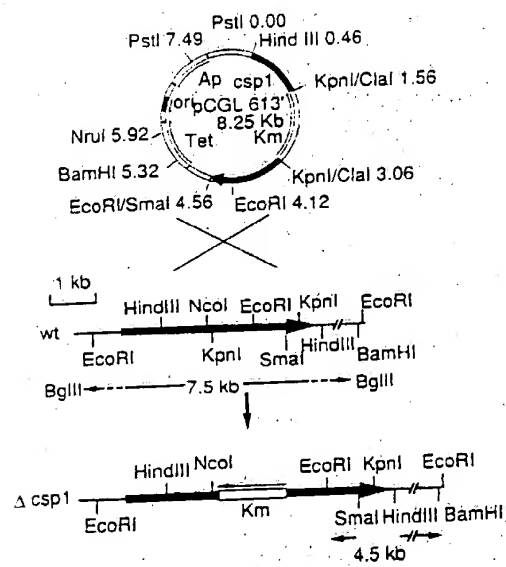
[illegible][illegible]

FIG. 5

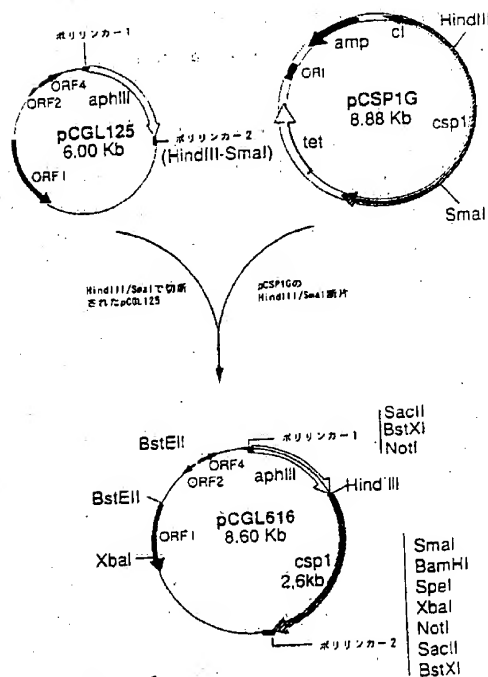
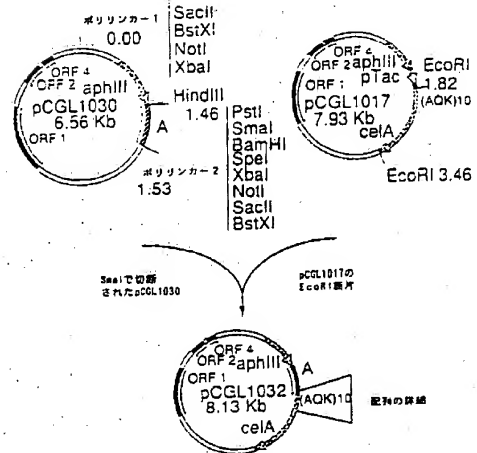
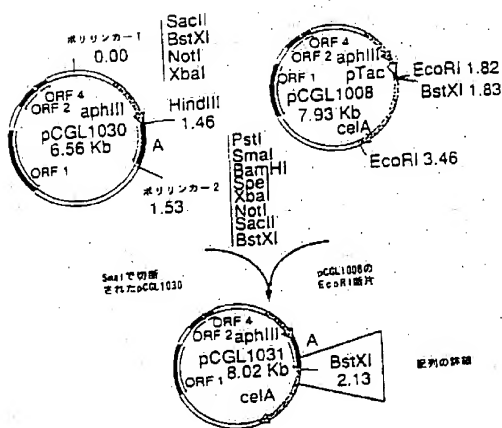
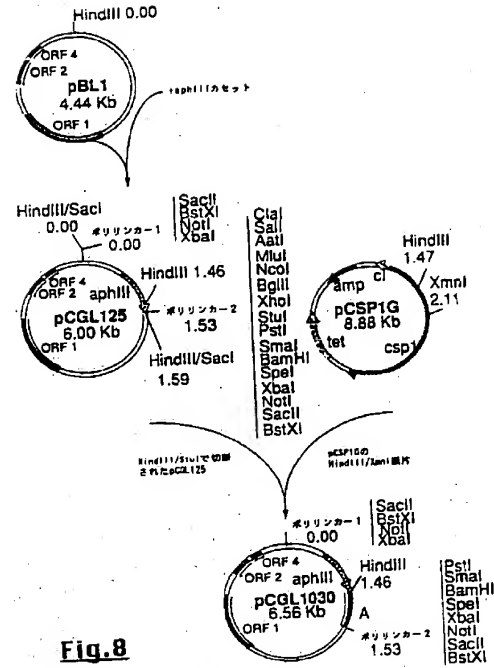
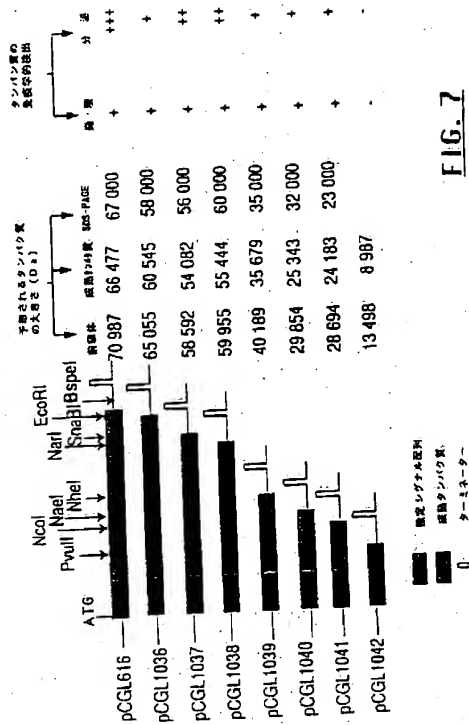


Fig. 6



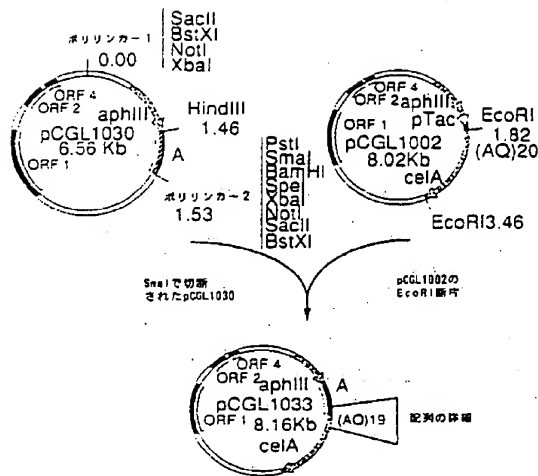


FIG. 11

GAATTCGTGGAATAGCCGCTTTAGTACTTTTCAGGGGTCTTATTCTTAC 52
 CAGATCGTCAAGTTGTGGGTAGAGTACCTGAATATTAATTGACCCGACCG 104
 GTGATATATGCTTATTGCTCAAGTACTTCGAGGTTAAGTGTATTATTAGGTG 156
 AACAAATTCAGCTTGGGTAGAGACCTTTCTATGCGCTTCAGAGCTTCTAT 208
 TAGGAAATCTGACACCACTTGATTAATAGCTTACCCCGAATTTGGGGATG 260
 GCTCATTTTGTCTGTGAAGGTAGTTTGTATGATATGACCTGCTGTTTATAA 312
 AGAAATGTAAAGCTGATCAGATCGATATAAAGAAACAGTTTGTACTCAGGT 364
 TTGAAGCATTTTCTCGGATTCGGCTGGCAAAATCTCAATGTCGCTTACAG 416
 TTTTCTCAACGACAGGCTGTAAAGTCTAGTCTGGTGGCTAGTGAAGTGG 468
 CTTTACTTGATATAAAGTAATCCATCTGCTGATCAGCCATTTTGGCTTCT 520
 TTCCATAGCAATCCAAAGGTTTGGCTTTCGATACCTATTCAGGAGCTTC 572
 GGCTCT ATG TTT AAC AAC GGT ATC CGC ACT GCA GCT CTT 611
 Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu
 GCT GGT CCA ATC CCA ATC TCC ACC CCA GCT TCC GGC GTT 650
 Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val
 GCT ATC CCA CCA TTC GCT CAG GAG ACC AAC CCA ACT TTC 689
 Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe
 AAC ATC ACC AAC GGC TTC AAC GAT GCT GAT GGA TCC ACC 728
 Asn Ile Thr Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr
 ATC CAG CCA GTT GGC CTT GTT AAC CAC ACC GAG GAA ACC 767
 Ile Gln Pro Val Gly Pro Val Asn Ala Thr Glu Glu Thr
 CTC CGC GAC CTG ACT GAC TCC ACC GGC GCT TAC CTG GAA 806
 Leu Arg Asp Leu Thr Asp Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Glu
 GAG TTC CAG AAC GGC ACC GTT GAG GAA ATC GTT GAA CCA 845
 Glu Phe Gln Asn Gly Thr Val Glu Glu Ile Val Glu Ala
 TAC CTG CAG GTT CAG GCT TCC GCA GAG GGA TTC GAT CTT 884
 Tyr Leu Gln Val Gln Ala Ser Ala Asp Gly Phe Asp Pro
 TCT GAG CAG GCT GCT TAC GAG GCT TTC GAG GCT GCT CGC 923
 Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Phe Glu Ala Ala Arg
 GTC GGT CCA TCC CAG GAG CTC GCA GCT TCC GGT GAG ACC 962
 Val Arg Ala Ser Gln Glu Leu Ala Ala Ser Ala Glu Thr

FIG. 12 (1ere planche)

ATC ACC AAG ACC CGC GAG TCC GTT GCT TAC GCA CTC AAG 1001
 Ile Thr Lys Thr Arg Glu Ser Val Ala Tyr Ala Leu Lys
 GTT GAC CAG GAA GCT ACC GCT GCT TTC GAG GCA TAC CGC 1040
 Val Asp Gln Glu Ala Thr Ala Phe Glu Ala Tyr Arg
 AAC GCA CTT CGC GAT GCA GCT ATC TCT ATC AAC CCA GAT 1079
 Asn Ala Leu Arg Asp Ala Ala Ile Ser Ile Asn Pro Asp
 GGC TCT ATC AAC CCA GAT ACC TCT ATC AAC CTA CTG ATC 1118
 Gly Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Ile Asn Leu Leu Ile
 GAT GCT GCT AAC GCT GCT AAC CGC ACC GAT GGT GCA GAG 1157
 Asp Ala Ala Asn Ala Ala Asn Arg Thr Asp Arg Ala Glu
 ATC GAG GAT TAC GCT CAC CTT TAC ACC CAG ACC GAT ATT 1196
 Ile Glu Asp Tyr Ala His Leu Tyr Thr Gln Thr Asp Ile
 GCT CTT GAA ACT CCA CAG CTT GCA TAC GCT TTC CAG GAC 1235
 Ala Leu Glu Thr Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Phe Gln Asp
 CTG AAG GCT CTT CAG GCT GAG GTC GAC GCA GAC TTC GAG 1274
 Leu Lys Ala Leu Gln Ala Glu Val Asp Ala Asp Phe Glu
 TGG TTG GGC GAG TTC GGA ATC GAC CAG GAA GAC GGT AAC 1313
 Trp Leu Gly Glu Phe Gly Ile Asp Gln Glu Asp Gly Asn
 TAC GTT CAG CGC TAC CAC CTC CCT GCT GTA GAG GCA CTC 1352
 Tyr Val Gln Arg Tyr His Leu Pro Ala Val Glu Ala Leu
 AAG GCT GAG GTC GAC GCT CGC GTC GCA GCA ATT GAG CCA 1391
 Lys Ala Glu Val Asp Ala Arg Val Ala Ala Ile Glu Pro
 CTT CGT GCA GAC TCC ATC GCT AAG AAC CTT GAG GCG CAG 1430
 Leu Arg Ala Asp Ser Ile Ala Lys Asn Leu Glu Ala Gln
 AAG TCT GAC GTT CTG GTT CGC CAG CTC TTC CTC GAG CGT 1469
 Lys Ser Asp Val Leu Val Arg Gln Leu Phe Leu Glu Arg
 GCA ACC GCA CAG CGC GAC ACC CTG GGT GTT GTA GAG GCG 1508
 Ala Thr Ala Gln Arg Asp Thr Leu Arg Val Val Glu Ala
 ATC TTC TCT ACC TCT GCT GCT TAC GTT GAA CTC TAC GAG 1547
 Ile Phe Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Val Glu Leu Tyr Glu
 AAC GTC GAG AAC GTT AAC GTT GAG AAC AAG ACC CTT CGC 1586
 Asn Val Glu Asn Val Asn Val Glu Asn Lys Thr Leu Arg

FIG. 12 (2eme planche)

CAG CAC TAC TCT GCG CTG ATC CCT AAC CTC TTC ATC GCA 1625
 Gln His Tyr Ser Ala Leu Ile Pro Asn Leu Phe Ile Ala
 GCA GTT GCA AAC ATC AGC GAG CTC AAC GCT GCA GAT GGT 1664
 Ala Val Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala
 GAA GCA GCA GCT TAC TAC CTC CAC TGG GAC ACC GAC CTC 1703
 Glu Ala Ala Ala Tyr Tyr Leu His Trp Asp Thr Asp Leu
 GCA ACC AAC GAT GAG GAC GAA GCT TAC TAC AAG GCT AAG 1742
 Ala Thr Asn Asp Glu Asp Glu Ala Tyr Tyr Lys Ala Lys
 CTC GAC TTC GCT ATC GAG ACC TAC GCA AAG ATC CTG TTC 1781
 Leu Asp Phe Ala Ile Glu Thr Tyr Ala Lys Ile Leu Phe
 AAC GGT GAA GTT TGG CAG GAG CCA CTC GCT TAC GTC CAG 1820
 Asn Gly Glu Val Trp Gln Glu Pro Leu Ala Tyr Val Gln
 AAC CTG GAT GCA GGC GCA GGT CAG GAA GCA GGT GAC GGT 1859
 Asn Leu Asp Ala Gly Ala Arg Gln Glu Ala Ala Asp Arg
 GAG GCA GCT CGC GCA GCT GAC GAA GCT TAC CGC GCT CAG 1898
 Glu Ala Ala Arg Ala Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Ala Glu
 CAG CTC CGC ATC GCT CAG GAA GCA GCT GAC GCT CAG AAG 1937
 Gln Leu Arg Ile Ala Gln Glu Ala Ala Asp Ala Gln Lys
 GCT ATC GCT GAG GCG CTT GCT AAG GAA GAA GGC AAC 1976
 Ala Ile Ala Glu Ala Leu Ala Lys Glu Ala Glu Gly Asn
 AAC GAC AAC TCC TCC GAC AAC ACG GAG ACC GGT TCT TCT 2015
 Asn Asp Asn Ser Ser Asp Asn Thr Glu Thr Gly Ser Ser
 GAC ATC GGA TCC TGG GGA CTT TTC GCA GCA ATT GCA GGT 2054
 Asp Ile Gly Ser Trp Gly Pro Phe Ala Ala Ile Ala Ala
 ATC ATC GCA GCA ATC GCA GGT ATC TTC CCA TTC CTC TCC 2093
 Ile Ile Ala Ala Ile Ala Ala Ile Phe Pro Phe Leu Ser
 GGT ATC GTT AAG TTC TAA TTTGAAACGAGATAGCTAAAGTTAAA 2139
 Gly Ile Val Lys Phe
 CCAGCTCCTTCTTCGGGAGGTGGTTTTCCTTGGCTAACAGCACCAAAA 2191
 GAAAGCCACCTCTCTGATCTCAAGGAGCTGCTTATCTTTTACTGGG 2243
 GAGCGGAGGTTGGCTCGATAAGCAAAATCTTTTGTCTTAAAGGGAAGT 2295

FIG. 12 (3eme planche)

GATAATCGGCTTAATGACTCGCCACTGGCGGAATCGGCAAGGCATCATTA 2347
 TTTGTTCCAGCGGGTAAGTGGCCAGAGCTTCTCGATCGGGAATTCGCCCTG 2399
 GCGCCACAAATGAACAGGCGGAGGATGAATCTTGAAGGACGGCGTCGCC 2451
 TCAATGATGGTCTGGAACTTCCAACACGGACCACTGACGGCCCAACCTCGA 2503
 AGGTAGCTTCCGTGCCAGGGGCGGGCGGCCACGAGACCGGCGGTACCGTT 2555
 GATCGCCCAAGGAATCGGCTGCTTGCCTGGTCAAGGCCACGACCACTGTA 2607
 TCGAGAGCGGAATTGCACACCATCGCCCGTCAGTTCCTTGATTTCCTCCGAG 2659
 GATCCTCATCCTTGGAGTTGATCGTGGGTAGCTCCGAGCTC 2702

FIG. 12 (4eme planche)

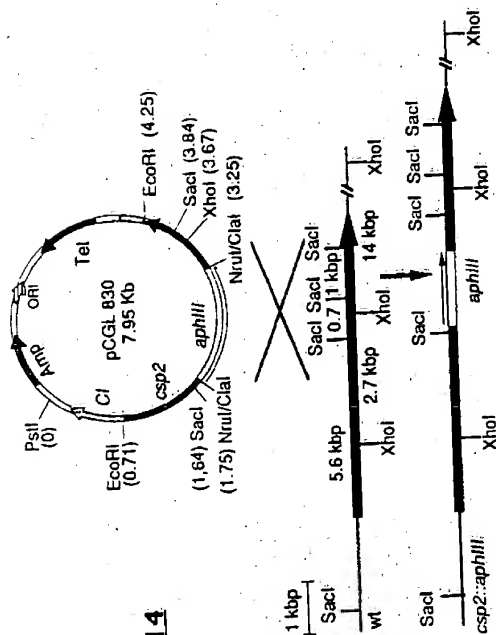


Fig. 14

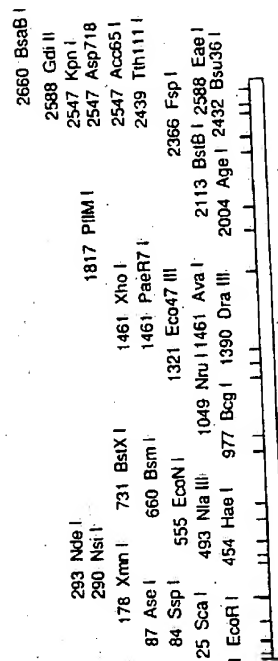


FIG. 13

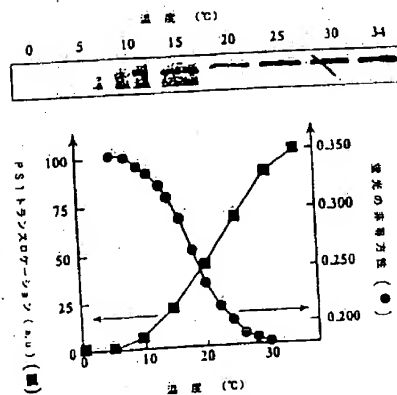


FIG. 15

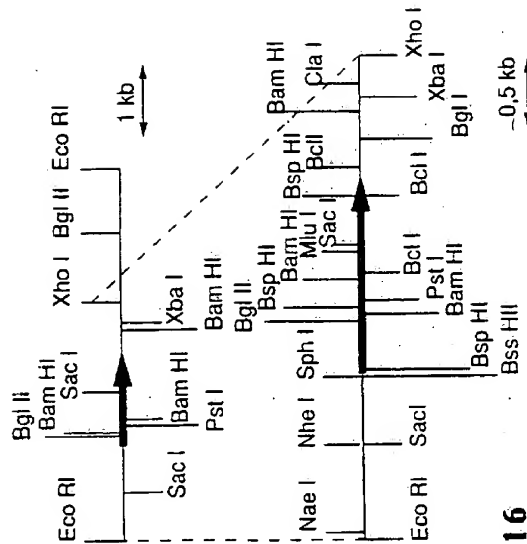


FIG. 16

OCTAGCTCGGAGCTCTAGGAGATTGTGAAAAACGGGTCAAATTTCTCGA 52
 TGCAGCGCTATATAAGTCTGACCAATTCATTTCAGGGTCTCAAGTCTGG 104
 CCAGGTTATATATAACCACTCAGTCAACTGGTCTCATTCGCTGGTGGATGAAT 156
 TTAATTAAAGAGAGACTTCATGCACTTACCGCGGCTTTTGGCATACAA 208
 TTGATAAACCTTAAGAAATTTTCAACAATTTTAATTTTGTGGTGCATATC 260
 TGTGCACTGCTCCATAATTGACCTGAGCATTACCAAGCTTAATGCGCCG 312
 AGTGAGTTAAGTCTCAAGCAAGTGTCTCTTTAGGCGATCCGTAGTTTA 364
 AAACCTTAAACCGTTAGGTATGCAAGCGGTTGATGTGAACCGAGTTTAA 416
 AAAGTTTCAGGATCAGATTTTTCACAGGCTATTTCCTCAAGCAAGCGCTAG 468
 GATGTACATGGTGGCTCAATGGGAACCAACATCACTAAATGGCCGAGA 520
 TACACACTTTAAATCTGTGGCGCATGCGAGCGAGATGGGAACGAGGAATC 572
 ATG ACA GTT GAT GAG CAG GTC TCT AAC TAT TAC GAC ATG 611
 met thr val asp glu gln val ser asn tyr tyr asp met
 CTT CTG AAG CGC AAT GCT GGC GAG CCT GAA TTT CAC CAG 650
 leu leu lys arg asn ala gly glu pro glu phe his gln
 GCA GTG CCA GAG GTT TTG GAA TCT TTG AAG ATC GTC CTG 689
 ala val ala glu val leu glu ser leu lys ile val leu
 GAA AAG GAC CCT CAT TAC GCT GAT TAC GGT CTC ATC CAG 728
 glu lys asp pro his tyr ala asp tyr gly leu ile gln
 CGC CTG TGC GAG OCT GAG CGT CAG CTC ATC TTC GGT GTG 767
 arg leu cys glu pro glu arg gln leu ile phe arg val
 CTT TGC GTT GAT GAC CAG GGC CAG GTC CAC GTC AAC CGT 806
 pro trp val asp asp gln gly gln val his val asn arg
 GGT TTC CGC GTG CAG TTC AAC TCT GCA CTT GCA CCA TAC 845
 gly phe arg val gln phe asn ser ala leu gly pro tyr
 AAG GGC GGC CTG CGC TTC CAC CCA TCT GTA AAC CTG GGC 884
 lys gly gly leu arg phe his pro ser val asn leu gly
 ATT GTG AAG TTC CTG GGC TTT GAG CAG ATC TTT AAA AAC 923
 ile val lys phe leu gly phe glu gln ile phe lys asn
 TCC CTA ACC GGC CTG CCA ATC GGT GGT GGC AAG GGT GGA 962
 ser leu thr gly leu pro ile gly gly gly lys gly gly

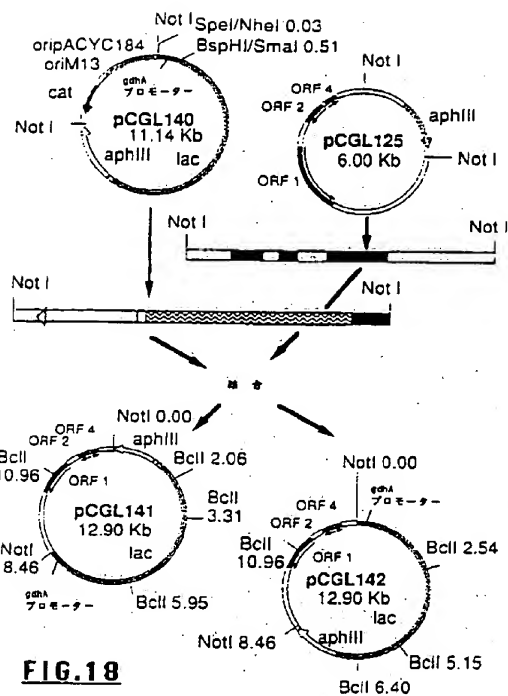
FIG. 17 (1ere planche)

TCC GAC TTC GAC COT AAG GGC AAG TCC GAT CTG GAA ATC 1001
 ser asp phe asp pro lys gly lys ser asp leu glu ile
 ATG COT TTC TGC CAG TCC TTC ATG ACC GAG CTG CAC CGC 1040
 met arg phe cys gln ser phe met thr glu leu his arg
 CAC ATC GGT GAG TAC CGC GAG GTT CCT GCA GGT GAC ATC 1079
 his ile gly glu tyr arg asp val pro ala gly asp ile
 GGA GTT GGT GGC CGC GAG ATC GGT TAC CTG TTT GGC CAC 1118
 gly val gly gly arg glu ile gly tyr leu phe gly his
 TAC COT CGC ATG GGC AAC CAG CAC GAG TCC GGC GTT TTG 1157
 tyr arg arg met ala asn gln his glu ser gly val leu
 ACC GGT AAG GGC CTG ACC TGG GGT GGA TCC CTG GTC CGC 1196
 thr gly lys gly leu thr trp gly gly ser leu val arg
 ACC GAG GCA ACT GGC TAC GGC TGC GTT TAC TTC GTG AGT 1235
 thr glu ala thr gly tyr gly cys val tyr phe val ser
 GAA ATG ATC AAG GCT AAG GGC GAG AGC ATC AGC GGC CAG 1274
 glu met ile lys ala lys gly glu ser ile ser gly gln
 AAG ATC ATC GTT TCC GGT TCC GGC AAC GTA GCA ACC TAC 1313
 lys ile ile val ser gly ser gly asn val ala thr tyr
 GCG ATT GAA AAG GCT CAG GAA CTC GGC GCA ACC GTT ATT 1352
 ala ile glu lys ala gln glu leu gly ala thr val ile
 GGT TTC TCC GAT TCC AGC GGT TGG TCT CAT ACC CCT AAT 1391
 gly phe ser asp ser ser gly trp val his thr pro asn
 GGC GTT GAC GTG GCT AAG CTC CGC GAA ATC AAG GAA GTT 1430
 gly val asp val ala lys leu arg glu ile lys glu val
 CGC CGC GCA CGC GTA TCC GTG TAC GGC GAC GAA GTT GAA 1469
 arg arg ala arg val ser val tyr ala asp glu val glu
 GGC GCA ACC TAC CAC ACC GAC GGC TCC ATC TGG GAT CTC 1508
 gly ala thr tyr his thr asp gly ser ile trp asp leu
 AAG TGC GAT ATC GCT CTT CTT TGT GCA ACT CAG AAC GAG 1547
 lys cys asp ile ala leu pro cys ala thr gln asn glu
 CTC AAC GGT GAG AAC GCT AAG ACT CTT GCA GAC AAC GGC 1586
 leu asn gly glu asn ala lys thr leu ala asp asn gly
 TGC COT TTC GTT GCT GAA GGC GGC AAC ATG COT TCC ACC 1625
 cys arg phe val ala glu gly ala asn met pro ser thr

FIG. 17 (2eme planche)

CCA GAG GCT GTT GAG GTC TTC COT GAG CGC GAC ATC CGC 1664
 pro glu ala val glu val phe arg glu arg asp ile arg
 TTC GGA CCA GGC AAG GCA GCT AAC GCT GGT GGC GTT GCA 1703
 phe gly pro gly lys ala ala asn ala gly gly val ala
 ACC TCC GCT CTG GAG ATG CAG CAG AAC GCT TCG CGC GAT 1742
 thr ser ala leu glu met gln gln asn ala ser arg asp
 TCC TGG ACC TTC GAG TAC ACC GAC GAG CGC CTC CAG GTG 1781
 ser trp ser phe glu tyr thr asp glu arg leu gln val
 ATC ATG AAG AAC ATC TTC AAG ACC TOT GCA GAG ACC GCA 1820
 ile met lys asn ile phe lys thr cys ala glu thr ala
 GCA GAG TAT GGA CAC GAG AAC GAT TAC GTT GTC GGC GCT 1859
 ala glu tyr gly his glu asn asp tyr val val gly ala
 AAC ATT GCT GGC TTC AAG AAG GTA GCT GAC GCG ATG CTG 1898
 asn ile ala gly phe lys lys val ala asp ala met leu
 GCA CAG GGC GTC ATC TAA CACCCCTGCACCTTACTTAAACCCCTGA 1944
 ala gln gly val ile OCH
 TCCGCGTTAAGGATCAGGGATTTTTGATTCTTCCAGGTCAATTATCCGATC 1996
 CACATGGGTTAATGCACTGTGCGGTGCGCAATGATGATCAACCGTGGTGTCT 2048
 TTAAGCGTGGCCAGAGTCTGCGAAGATCCGCTGATTGAGCGCATCTTGGT 2100
 GCGTGGTGGCTTCATCGACAATCAGTACCTGAGGCGTGGTCCCAAGGCAGC 2152
 CGCCAGGCAGAGCGGTTGTTGCTGTCCGCCAGATAGGC 2190

FIG. 17 (3eme planche)



DGF1: 32 mer

5' AATTCCATGGCAATGGCCGGCCTGTGACACCC 3'

DGF2: 28 mer

5' GGGGTGACAGGCCGGCCATTGCCATGG 3'

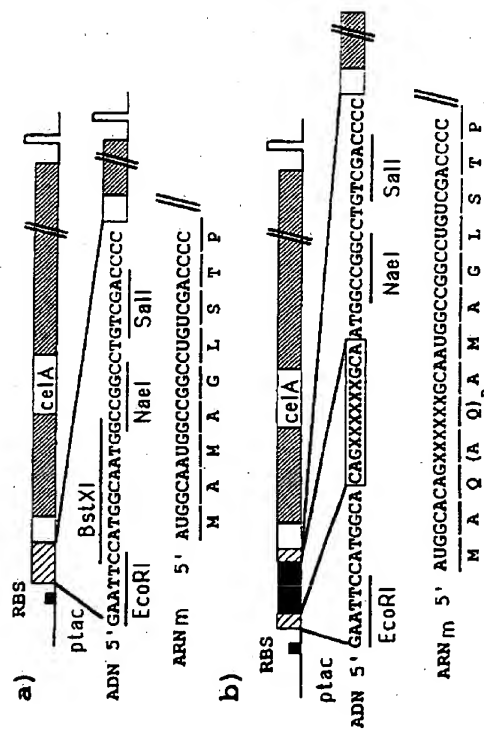
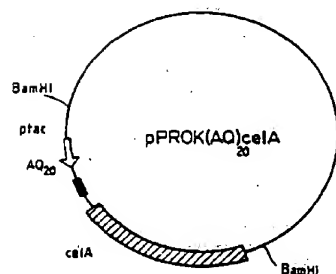
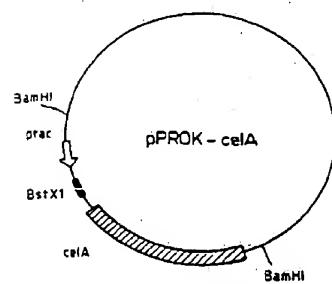
DGF5: 120 mer

5' CAGGCACAGGCTCAGGCCAGGCACAGGCCAGGCCAGG
 CCCAGGCCAGGCTCAGGCACAGGCCAGGCCAGGCCA
 GGCACAGGCACAGGCTCAGGCCAGGCTCAGGCTCAGGCA 3'

DGF6: 120 mer

5' TGAGCCTGAGCCTGCGCCTGAGCCTGTGCTGTGCTGCG
 CCTGCGCCTGCGCCTGTGCTGAGCCTGTGCTGTGCTGCG
 CGCCTGCGCCTGTGCTGTGCGCCTGAGCCTGTGCTGTGCG 3'

FIG. 19



特許平6-502548 (31)

手続補正書

平成 5 年 6 月 22 日

特許庁長官 麻生 啓 殿

- 1 事件の表示
平成 5 年 特許願 第 503324 号
PCT/FR 92/00744
- 2 発明の名称
特にコリネバクテリア中で用いることのできる炭水化物の発現および分岐系
- 3 補正をする者
事件との関係 特許出願人
オルサン
- 4 代理人 (郵便番号 100)
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号
〔電話東京 (3211) 2321 大代表〕
5428 弁護士 佐藤 一
- 5 補正命令の日付
発送日 平成 年 月 日
- 6 補正の対象
特許法第 184 条の 5 第 1 項の規定による審判の出願人の職、委任状、及び法人証明書、明細書、請求の範囲及び要約書
- 7 補正の内容
1) 別紙の通り
2) 明細書、請求の範囲、要約書の修正 (内容に変更なし)

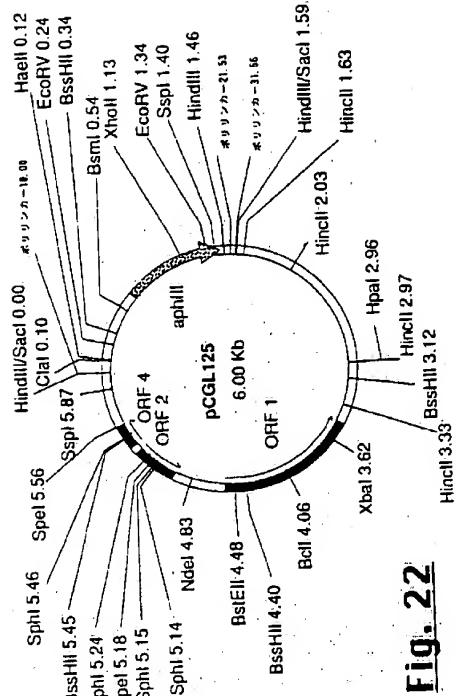


Fig. 22

国際調査報告		International application No.
		PCT/FR 92/00744
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. 5 C12N1/52; C12N1/21; C12N1/50 C07K15/00; C07K15/08; A61K39/40 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. RELEVANT SEARCHED Abstracts of documents searched (indicate the system followed by classification system) Int. Cl. 5 C12N; C07K		
Documents searched other than those mentioned in the abstract (if such documents are included in the table reported)		
Documents dated from the date of the international search (date of date base end, where appropriate, search is made)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevance to claim No.
A	WO, A. 8 809 821 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 15 December 1988	1-34
A	FR, A. 2 575 492 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 4 July 1986	1-34
A	BIO/TECHNOLOGY vol. 8, No. 6, June 1990, NATURE AMERICA, INC., NEW YORK, US pages 559 - 563 M.-A. PETIT ET AL. 'Hypersecretion of a cellulase from Clostridium thermocellum in Bacillus subtilis by induction of chromosomal dna amplification'	1-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the classification of class C. <input type="checkbox"/> See patent family sources.		
* Special categories of prior documents: "A" documents relating to the prior art of the invention as claimed in the claims of the application. "X" documents not pertinent to the prior art of the invention as claimed in the claims of the application but which are pertinent to the prior art of the invention as claimed in the claims of the application. "Y" documents which may have been taken into account in the prior art of the invention as claimed in the claims of the application but which are not pertinent to the prior art of the invention as claimed in the claims of the application. "Z" documents which are not pertinent to the prior art of the invention as claimed in the claims of the application but which are pertinent to the prior art of the invention as claimed in the claims of the application.		
Date of the actual completion of the international search 29 October 1992 129.10.921		Date of mailing of the international search report 4 November 1992 104.11.921
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Parisville No.		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告		International application No.
		PCT/FR 92/00744
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevance to claim No.
A	BIO/TECHNOLOGY vol. 9, No. 1, January 1991, NATURE AMERICA, INC., NEW YORK, US pages 84 - 87 A. SCHWARZ AND A. PUHLER 'Manipulation of Clostridium glutamicum by gene disruption and replacement'	1-34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

国際調査報告

FR 9200744
SA 61234

This sheet lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file as of 29/10/92. The European Patent Office is in no way liable for errors contained herein and merely gives the purpose of information. 29/10/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD-A-8809821	15-12-88	US-A- 4965197	23-10-90
FR-A-2575492	04-07-86	JP-A- 61268185	27-11-86

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/90

C 1 2 P 21/00

21/08

8214 -4B

8214 -4B

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:15)

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), JP, US

(72) 発明者 レブロン, ジェラル
フランス国レ, ジュリ, アレー, デ, パート, 5

(72) 発明者 デュシロン, フランシス
フランス国アボン, リュ, メルモ, 25, レジダンス, ラ, フォンテーヌ, オ, ボワ

(72) 発明者 ルノー, ミシェル
フランス国レ, ジュリ, リュ, デ, コース, 23